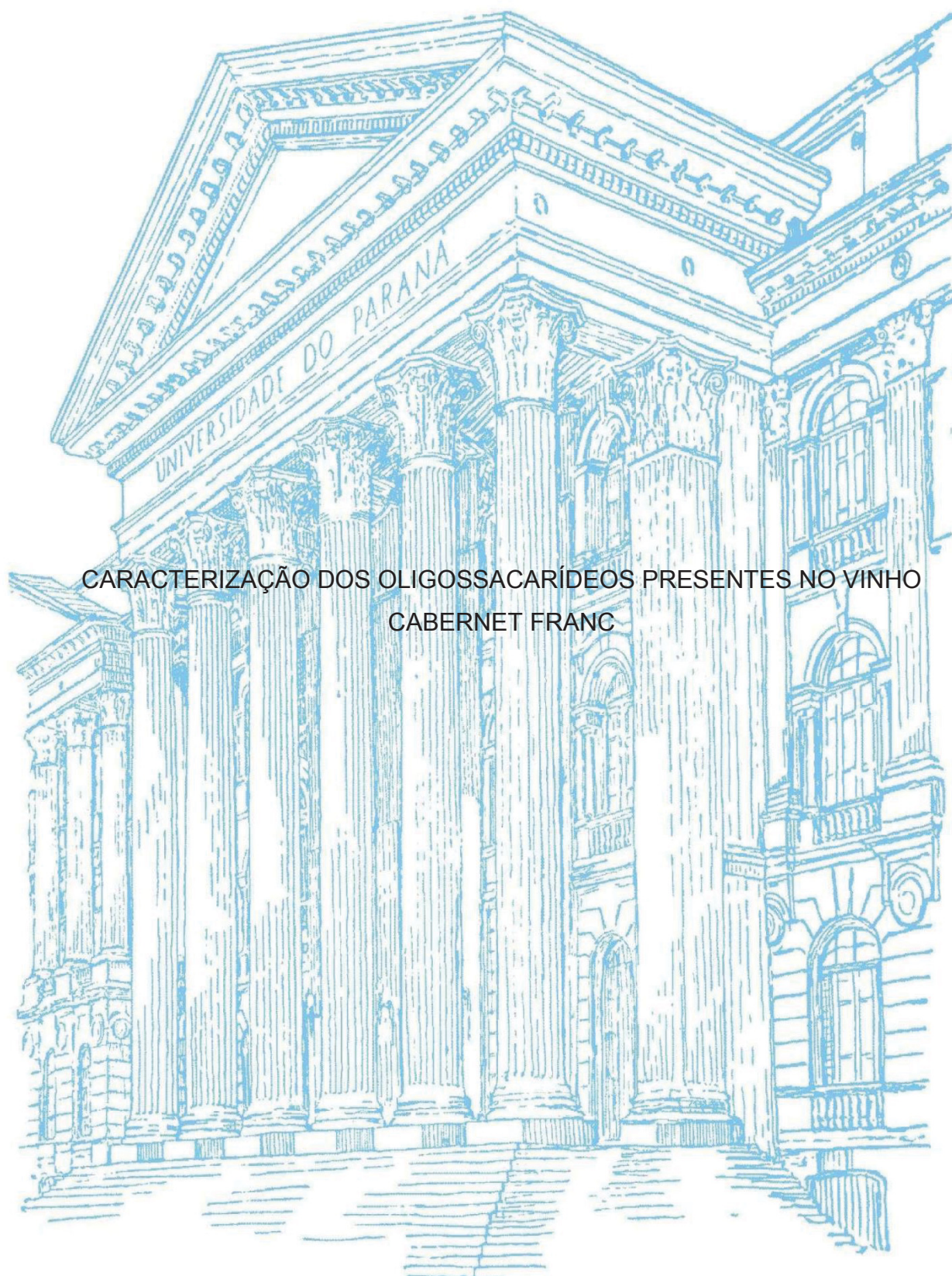


ANDRÉ EDUARDO DOS SANTOS



CARACTERIZAÇÃO DOS OLIGOSSACARÍDEOS PRESENTES NO VINHO
CABERNET FRANC

CURITIBA

2019

ANDRÉ EDUARDO DOS SANTOS

CARACTERIZAÇÃO DOS OLIGOSSACARÍDEOS PRESENTES NO VINHO
CABERNET FRANC

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Bioquímica, no Curso de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica), Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Profº Drº Guilherme Lanzi Sassaki
Co-orientador: Drº Arquimedes Paixão de Santana Filho

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Santos, André Eduardo dos
Caracterização dos oligossacarídeos presentes no vinho Cabernet
Franc. / André Eduardo dos Santos. – Curitiba, 2019.
71 p.: il.

Orientador: Guilherme Lanzi Sassaki
Coorientador: Arquimedes Paixão de Santana Filho

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

1. Vinho 2. Oligossacarídeos 3. Estrutura química I. Título II. Sassaki,
Guilherme Lanzi III. Santana Filho, Arquimedes Paixão de IV.
Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa
de Pós-Graduação em Bioquímica.

CDD (22. ed.) 572.56

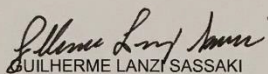


MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
(BIOQUÍMICA) - 40001016003P2

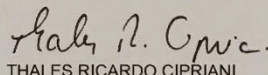
TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **ANDRÉ EDUARDO DOS SANTOS** intitulada: **Caracterização dos oligossacarídeos presentes no vinho Cabernet Franc**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa. A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

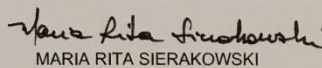
CURITIBA, 25 de Março de 2019.


GUILHERME LANZI SASSAKI

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


THALES RICARDO CIPRIANI

Avaliador Interno (UFPR)


MARIA RITA SIERAKOWSKI

Avaliador Externo (UFPR)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, ao meu orientador Professor Doutor Guilherme Lanzi Sassaki, pelo acompanhamento, ensinamentos, paciência e orientação.

Ao meu co-orientador Doutor Arquimedes Paixão de Santana Filho, pela dedicação, conversas, ensinamentos e orientação.

Ao Professor Doutor Thales Ricardo Cipriani e à Professora Doutora Maria Rita Sierakowski por aceitarem o convite em participar da banca e avaliar este trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica) da Universidade Federal do Paraná.

Às agências de fomento, principalmente ao CNPq pelo suporte financeiro durante esses dois anos.

À técnica de Espectrometria de Massas Doutora Flávia Lada Degaut Pontes, por todas as análises no MicrO-TOF.

Às amigas que fiz pelo Departamento de Bioquímica e Química, em especial ao Leo por toda ajuda nas análises de RMN e pelas conversas; Ao Kimura, por todos os conselhos; À Iglesias por toda ajuda e incentivo; À Gabi, pela amizade desde a graduação.

Por fim, aos meus pais por sempre acreditarem no meu potencial e me incentivarem a fazer a diferença independente do contexto em que eu estivesse inserido.

RESUMO

O vinho é uma bebida resultante do processo fermentativo alcoólico de uvas, sendo as variedades da espécie *Vitis vinífera* as mais comumente utilizadas. Sua constituição química é formada por compostos fenólicos, compostos nitrogenados, sais minerais, ácidos orgânicos e carboidratos. Os carboidratos de maior relevância dos vinhos são os polissacarídeos e oligossacarídeos. Dentre os polissacarídeos, os mais importantes são os provenientes das leveduras e as pectinas das bagas de uva. Os oligossacarídeos encontrados no vinho são provenientes do processo de fermentação alcoólica e poucos estudos relatam a caracterização estrutural dessas moléculas. O objetivo do presente trabalho é a caracterização estrutural dos oligossacarídeos presentes no vinho da variedade Cabernet Franc. Os oligossacarídeos foram purificados por partições líquido-líquido com solventes orgânicos e cromatografia de adsorção com fase estacionária de carvão ativado-celite (1:1) com um gradiente de H₂O:EtOH. Para a caracterização das estruturas foram empregadas as técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Espectrometria de Massas (EM) e Cromatografia em Camada Delgada (TLC) em conjunto com modificações químicas das estruturas. Como resultados os oligossacarídeos do vinho Cabernet Franc demonstraram uma composição monossacarídica diversificada, apresentando a D-glucose como monossacarídeo majoritário (66,29 %), seguida pela D-galactose (6,26 %), L-arabinose (5,81 %), D-xilose (5,57 %), D-manose (5,40 %), ácido D-galacturônico (4,74 %), L-ramnose (3,29 %) e ácido D-glucurônico (2,63 %). Entre as estruturas identificadas, foram confirmadas a presença de sacarose, trealose, maltose, isomaltotriose, panose e uma etil-glucopiranoose que ainda não foi descrita na composição dos oligossacarídeos de vinhos. Outros dissacarídeos e trissacarídeos identificados são derivados de arabinogalactanas, mananas e xilanas. Oligossacarídeos provenientes da degradação de hemicelulose foram identificados pelos assinalamentos característicos de xilose e ácido 4-O-metil-glucurônico nos mapas de correlação 2D ¹H/¹³C HSQC de RMN.

Palavras Chaves: Vinho, oligossacarídeos, caracterização estrutural.

ABSTRACT

Wine is a beverage resulting from the alcoholic fermentation process of grapes, being the varieties of the species *Vitis vinifera* most commonly used. Its chemical constitution is formed by phenolic compounds, nitrogen compounds, minerals salts, organic acids and carbohydrates. The most important carbohydrates of the wines are polysaccharides and oligosaccharides. Among the polysaccharides, the most relevant are those derived from yeast and pectin from grape berries. The oligosaccharides found in wine are derived from the alcoholic fermentation process and few studies report the structural characterization of these molecules. The objective of the present work is the structural characterization of the oligosaccharides present in the Cabernet Franc wine. The oligosaccharides were purified by liquid-liquid partition with organic solvents and adsorption chromatography with activated charcoal-celite (1:1) stationary phase with a gradient of H₂O:EtOH as eluent. For the characterization of the structures, Nuclear Magnetic Resonance (NMR), Mass Spectrometry (EM) and Thin Layer Chromatography (TLC) techniques allied with chemical modifications of the structures were used. As a result, oligosaccharides of the Cabernet Franc wine presented a diversified monosaccharide composition, with D-glucose as main monosaccharide (66,29 %), followed by D-galactose (6,26 %), L-arabinose (5,81 %), D-xylose (5,57 %), D-mannose (5,40 %), D-galacturonic acid (4,74 %), L-rhamnose (3,29 %) and D-glucuronic acid (2,63 %). Among the identified structures, sucrose, trehalose, maltose, isomaltotriose, panose and an ethyl-glucopyranose, that hasn't been previously described in the composition of wine oligosaccharides, have been confirmed. Other identified disaccharides and trisaccharides are derived from arabinogalactans, mannans and xylans. Oligosaccharides from hemicellulose degradation were also identified through characteristic assignments of xylose and 4-O-metyl-glucuronic acid on the 2D ¹H/¹³C NMR HSQC correlation maps.

Key words: Wine, oligosaccharides, structural characterization.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESTRUTURA SECCIONADA DE UMA BAGA DE UVA MADURA.....	15
FIGURA 2 – ESTRUTURA QUÍMICA DA PECTINA	17
FIGURA 3 – FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE VINIFICAÇÃO PARA OS VINHOS BRANCOS, TINTOS E ROSÉS	20
FIGURA 4 – 1: ESPECTRO DE RMN 1D ^1H DOS OLIGOSSACARÍDEOS PRESENTES NO VINHO CABERNET FRANC ANTES DOS PROCEDIMENTOS DE PURIFICAÇÃO. 2: ESPECTRO DE RMN 1D ^1H DOS OLIGOSSACARÍDEOS PRESENTES NO VINHO CABERNET FRANC APÓS OS PROCEDIMENTOS DE PURIFICAÇÃO. REGIÃO DE FENÓLICOS (δ 6,85 – 8,00) AUMENTADA 16x. AMBAS AS AMOSTRAS FORAM SOLUBILIZADAS EM D_2O A 30 °C COM REFERÊNCIA O TMSP-2,2,3,3- d_4 . A: REGIÃO DE COMPOSTO FENÓLICOS; B: REGIÃO ANOMÉRICA; C: REGIÃO DOS CARBONOS C2-C6; D: REGIÃO DE DEOXY E ACETIL.....	39
FIGURA 5 – PLACA DE TLC DE SILICA GEL 60G COM PADRÕES DE MONOSSACARÍDEOS E AMOSTRA INTEGRAL APÓS METANÓLISE E HIDRÓLISE. FASE MÓVEL UMA MISTURA DE ACETATO DE ETILA:N-PROPANOL:ÁCIDO ACÉTICO:ÁGUA (4:2:2:1). SOLUÇÃO REVELADORA DE ORCINOL: H_2SO_4	41
FIGURA 6 – ESPECTRO DE RMN 1D ^1H DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA AMOSTRA INTEGRAL APÓS METANÓLISE E HIDRÓLISE COM TFA (0,5 M). JANELA DE δ 4,45 a 5,35. AMOSTRA SOLUBILIZADA EM D_2O A 30 °C, REFERÊNCIA INTERNA TMSP-2,2,3,3- d_4	41
FIGURA 7 - MAPA DE CORRELAÇÃO 2D $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA AMOSTRA INTEGRAL APÓS METANÓLISE E HIDRÓLISE COM TFA (0,5 M). JANELA DE δ 89,00/4,48 a 100,0/5,25. AMOSTRA SOLUBILIZADA EM D_2O A 30 °C, REFERÊNCIA INTERNA TMSP-2,2,3,3- d_4	42

FIGURA 8 – REGIÃO ANOMÉRICA (δ 90,0/4,20 – 115,0/5,50) DO MAPA DE CORRELAÇÃO 2D $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC EDITADO DA AMOSTRA INTEGRAL. AMOSTRA EM D_2O A 30 °C, REFERÊNCIA INTERNA TMSP-2,2,3,3- d_4 E DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EXPRESSOS EM PPM. A: L-Araf; B: D-Galp; C: L-Rhap; D: D-GalpA; E: D-Manp; F: D-Glcp; H: D-Xilp. TR: TERMINAL REDUTOR 45

FIGURA 9 – MAPA DE CORRELAÇÃO 2D $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC EDITADO REGIÃO (δ 55,0/2,96 – 90,0/3,66). AMOSTRA INTEGRAL EM D_2O A 30 °C, REFERÊNCIA INTERNA TMSP-2,2,3,3- d_4 E DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EXPRESSOS EM PPM. M: 4-O-Metil-GlcpA 45

FIGURA 10 – MAPA DE CORRELAÇÃO 2D $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC EDITADO (δ 53,0/2,80 – 113,0/5,80). AMOSTRA DA FRAÇÃO ETANÓLICA 10% REDUZIDA COM NaBH_4 DILUÍDA EM D_2O A 30 °C, REFERÊNCIA INTERNA TMSP-2,2,3,3- d_4 E DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EXPRESSOS EM PPM. A: L-Araf; B: D-Galp; C: L-Rhap; D: D-GalpA; E: D-Manp; F: D-Glcp; H: D-Xilp, M: 4-O-Metil-GlcpA46

FIGURA 11: REGIÃO ANOMÉRICA (δ 90,0/4,20 – 115,0/5,50) DO MAPA DE CORRELAÇÃO 2D $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC EDITADO DA AMOSTRA INTEGRAL REDUZIDA COM NaBH_4 . AMOSTRA INTEGRAL EM D_2O A 30 °C, REFERÊNCIA INTERNA TMSP-2,2,3,3- d_4 E DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EXPRESSOS EM PPM. A: L-Araf; B: D-Galp; C: L-Rhap; E: D-Manp; F: D-Glcp..... 47

FIGURA 12 – A: MAPA DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA 2D $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HMBC (PRETO) COM MAPA DE CORRELAÇÃO 2D $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC EDITADO (AZUL E ROSA). AMOSTRA INTEGRAL APÓS OXIDAÇÃO COM NaIO_4 EM D_2O A 30 °C, REFERÊNCIA INTERNA TMSP-2,2,3,3- d_4 , DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EXPRESSOS EM PPM. B: ESTRUTURA PROPOSTA COM OS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EM PPM..... 49

FIGURA 13 – MAPA DE CORRELAÇÃO HOMONUCLEAR 2D $^1\text{H}/^1\text{H}$ TOCSY. AMOSTRA INTEGRAL APÓS OXIDAÇÃO COM NaIO_4 EM D_2O A 30 °C, REFERÊNCIA INTERNA TMSP-2,2,3,3- d_4 E DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EXPRESSOS EM PPM..... 50

FIGURA 14 – ESPECTRO DE MASSAS FULL SCAN EM MODO POSITIVO DE IONIZAÇÃO. OS ÍONS (m/z) DOS OLIGOSSACARÍDEOS FORAM OBTIDOS NA SUA FORMA REDUZIDA E ADUTADOS COM Li^+ 52

FIGURA 15 – ESPECTRO DE MASSAS MRM EM MODO POSITIVO DE IONIZAÇÃO. OS FRAGMENTOS DE MASSA (m/z) DOS OLIGOSSACARÍDEOS FORAM OBTIDOS NA SUA FORMA REDUZIDA E ADUTADOS COM Li^+ . OS ÍONS FORMADOS NO ESPECTRO DE BAIXA ENERGIA CID MS/MS DE 351,14 m/z . FRAGMENTOS FORMADOS SÃO CONSISTENTES COM $[\text{Hex}_2 \cdot \text{Li}]^+$. A m/z 189,09 $[\text{M-B}_1 \cdot \text{Li}]^+$ E A m/z DE PERDA NEUTRA 162,05..... 53

FIGURA 16 – ESPECTRO DE MASSAS MRM EM MODO POSITIVO DE IONIZAÇÃO. OS FRAGMENTOS DE MASSA (m/z) DOS OLIGOSSACARÍDEOS FORAM OBTIDOS NA SUA FORMA REDUZIDA E ADUTADOS COM Li^+ . OS ÍONS FORMADOS NO ESPECTRO DE BAIXA ENERGIA CID MS/MS DE 423,19 m/z . FRAGMENTOS FORMADOS NO MRM SÃO CONSISTENTES COM $[\text{Xil}_3 \cdot \text{Li}]^+$. A m/z 215,11 $[\text{M-}^{2,5}\text{A}_1 \cdot \text{Li}]^+$ E A m/z DE PERDA NEUTRA 208,08..... 53

FIGURA 17 – ESPECTRO DE MASSAS MRM EM MODO POSITIVO DE IONIZAÇÃO. OS FRAGMENTOS DE MASSA (m/z) DOS OLIGOSSACARÍDEOS FORAM OBTIDOS NA SUA FORMA REDUZIDA E ADUTADOS COM Li^+ . OS ÍONS FORMADOS NO ESPECTRO DE BAIXA ENERGIA CID MS/MS DE 483,18 m/z . FRAGMENTOS FORMADOS NO MRM SÃO CONSISTENTES COM $[\text{L-Araf} \rightarrow \text{D-Galp}_2 \cdot \text{Li}]^+$. A m/z 351,14 $[\text{M-Y}_2 \cdot \text{Li}]^+$ COM UMA PERDA NEUTRA DE 132,04 m/z . OUTRO FRAGMENTO DE 275,10 m/z $[\text{M-}^{1,5}\text{X}_1 \cdot \text{Li}]^+$ COM PERDA NEUTRA DE 208,08 m/z 54

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DOS OLIGOSSACARÍDEOS ISOLADOS DA AMOSTRA INTEGRAL OBTIDA DA FRAÇÃO ETANÓLICA DA FASE AQUOSA DO VINHO CABERNET FRANC..... 40

TABELA 2 – DADOS DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS (EM) E RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) DOS OLIGOSSACARÍDEOS PRESENTES NO VINHO CABERNET FRANC..... 52

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

δ	Deslocamento químico
1J	Acoplamento via uma ligação
2J	Acoplamento via duas ligações
3J	Acoplamento via três ligações
4-O-metil-GlcpA	Ácido 4-O-metil-Glucurônico piranosídico
AGP	Arabinogalactana-proteína
Araf	Arabinose furanosídica
CF	Cabernet Franc
D ₂ O	Água deuterada
EM	Espectrometria de massas
EtOH	Etanol
Fuc	Fucose
GalpA	Ácido galacturônico piranosídico
Galp	Galactose piranosídica
GlcP	Glucose piranosídica
GlcP A	Ácido glucurônico piranosídico
H ₂ O	Água
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HCl	Ácido clorídrico
HGs	Homogalacturonanas
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence
Hz	Hertz
LiCl	Cloreto de Lítio
LiOH	Hidróxido de Lítio
<i>m/z</i>	relação massa carga
Mal	Maltose
Manp	Manose piranosídica
MeOH	Metanol
MPs	Manoproteínas
MRM	Monitoramento de reações múltiplas
NaBH ₄	Boroidreto de sódio

NaIO ₄	Metaperiodato de sódio
PPM	Partes por milhão (deslocamento químico)
PRAGs	Polissacarídeos ricos em arabinose e galactose
RG I	Ramnogalacturonana do tipo I
RG II	Ramnogalacturonana do tipo II
Rhap	Ramnose piranosídica
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
Sac	Sacarose
TFA	Ácido trifluoroacético
TLC	Cromatografia de camada delgada
Tre	Trealose
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
Xilp	Xilose piranosídica

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 UVA.....	14
2.1.1 Estrutura e constituição da uva.....	15
2.1.2 Microbiologia da baga de uva	18
2.1.3 Uva Cabernet Franc.....	19
2.2 PROCESSO DE VINIFICAÇÃO	19
2.2.1 Colheita.....	20
2.2.2 Desengace e esmagamento	21
2.2.3 Fermentação alcoólica	21
2.2.5 Clarificação, estabilização, filtração e engarrafamento.....	23
2.3 CLASSIFICAÇÃO DOS VINHOS	24
2.4 CONSTITUIÇÃO DOS VINHOS.....	25
2.4.1 Compostos fenólicos, compostos nitrogenados e ácidos orgânicos	25
2.4.2 Polissacarídeos presentes no vinho	27
2.4.3 Oligossacarídeos presentes nos vinhos	30
3. OBJETIVOS	32
3.1 OBJETIVO GERAL	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 MATERIAL DE ESTUDO	33
4.2 OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS OLIGOSSACARÍDEOS	33
4.2.1 Extração dos oligossacarídeos pelo sobrenadante da precipitação etanólica	33
4.2.2 Purificação dos oligossacarídeos.....	33

4.3 ANÁLISE ESTRUTURAL E CARACTERIZAÇÃO DOS OLIGOSSACARÍDEOS	34
4.3.1 Análise da composição monossacarídica	34
4.3.2 Redução dos terminais redutores dos oligossacarídeos com Borohidreto de Sódio (NaBH_4)	35
4.3.3 Oxidação com metaperiodato de sódio (NaIO_4).....	35
4.3.4 Análise estrutural por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	35
4.3.5 Análise estrutural por Espectrometria de Massas.....	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO.....	38
5.2 COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA	39
5.3 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL	42
5.3.1 Análises por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	42
5.3.2 Análises com Espectrometria de Massas	50
6. CONCLUSÕES	55
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

1. INTRODUÇÃO

O vinho é uma das bebidas com maior presença em nossa sociedade, chegando a apresentar um caráter cultural e religioso para a vida de diversas populações a milhares de anos (JACKSON, 2008; WANSBROUGH *et al.*, 2017). Como consequência, o vinho apresenta um grande impacto econômico, onde movimenta em torno de 30 bilhões de euros anualmente (INTERNATIONAL ORGANISATION OF VINE AND WINE, 2018).

Por lei, o vinho é a bebida resultante do processo fermentativo alcoólico realizado do mosto de uva sã, fresca e madura. Este processo consiste na conversão dos açúcares presentes na uva para álcool e gás carbônico, por intermédio da ação de leveduras. A espécie de uva *Vitis vinifera* é a mais utilizada para a produção, sendo ela também um parâmetro da qualidade do vinho que é instituído na legislação. O fruto uva é constituído basicamente pelo suco e bagaço, sendo que o bagaço é formado pela casca, as sementes, a polpa e a haste. Na composição do suco da uva encontramos a água (79%), os carboidratos (20%) e os ácidos orgânicos com os compostos fenólicos, minerais e componentes nitrogenados (1%). A composição desses carboidratos, é em sua maior quantidade, formada por frutose e glucose, que são as principais matérias primas utilizadas pelas leveduras no processo de fermentação alcoólica que origina o vinho (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006; CONDE *et al.*, 2007; JACKSON, 2008; BEN; MONTEIRO, 2017).

A constituição do vinho o torna uma bebida complexa, onde apresenta uma diversidade de moléculas resultantes do metabolismo da fermentação. Como principal produto do processo temos o álcool etílico e as macromoléculas mais presentes são os compostos fenólicos e os carboidratos (CARPITA; GIBEAUT, 1993; JACKSON, 2008). A composição dessas moléculas varia de vinho para vinho e já é evidenciado que existe uma interação, perceptível sensorialmente, entre esses polifenóis e as moléculas de polissacarídeos e oligossacarídeos (RIOU *et al.*, 2002; VIDAL *et al.*, 2004; QUIJADA-MORÍN *et al.*, 2012, 2014.) Dos compostos fenólicos o mais abundante são os flavonoides, onde diversos estudos relatam sua influência contra doenças cardíacas e outros benefícios à saúde que podem trazer (AVIRAM; FUHRMAN, 2002; FUHRMAN; AVIRAM, 2002; CUEVA *et al.*, 2017; FERNANDES *et al.*, 2017).

Os carboidratos que estão presentes nos vinhos têm sua origem do próprio fruto da uva, das leveduras e de possíveis bactérias ou fungos e a maior parte destas moléculas é constituída dos polissacarídeos (JACKSON, 2008). Para a enologia, os polissacarídeos de maior importância são os provenientes das bagas de uva e das leveduras. Das uvas encontramos os polissacarídeos ricos em arabinoses e galactose representados pelas arabinanas e principalmente pelas arabinogalactana-proteínas do tipo II (AGP-II). As ramnogalacturonanas do tipo I (RG-I) e tipo II (RG-II), assim como as homogalacturonanas (HLs) também são provenientes das bagas de uva. De origem decorrente das leveduras no processo de fermentação temos como representantes as glucanas, as mananas, e principalmente, as manoproteínas (MPs) (PELLERIN *et al.*, 1995, 1996; PELLERIN; CABANIS, 1998; GONÇALVES *et al.*, 2002; VIDAL *et al.*, 2003; MARTÍNEZ-LAPUENTE *et al.*, 2013).

Os oligossacarídeos presentes no vinho, no início eram vistos apenas como sacarose ou outros dissacarídeos. Posteriormente, foram encontrados ácidos galacturônicos de cadeia curta que possuíam sua origem decorrente da degradação das regiões lisas das pectinas (DOCO *et al.*, 1997; PELLERIN; CABANIS, 1998). Atualmente, a caracterização desses oligossacarídeos tem sido realizada em alguns trabalhos, como nos vinhos Carignan (DUCASSE *et al.*, 2010; DOCO *et al.*, 2015), Merlot (DUCASSE *et al.*, 2010, 2011), Grignolino e Chardonnay (BORDIGA *et al.*, 2012), Monastrell, Cabernet Sauvignon e Syrah (APOLINAR-VALIENTE *et al.*, 2014, 2015), Tempranillo (MARTÍNEZ-LAPUENTE *et al.*, 2016).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O vinho é uma bebida que está presente na história da humanidade e que apresenta um forte caráter cultural em diversas sociedades. Existem evidências de sua produção desde o período Neolítico, assim como escritores relatam sobre os seus benefícios e consumo a mais de 5000 anos em regiões como o Mediterrâneo, Egito e Sudoeste asiático (MCGOVERN; FLEMING; KATZ, 2005; JACKSON, 2008; RODRIGUES; PARR, 2019).

Atualmente, segundo os dados apresentados pela *International Organisation of Vine and Wine* no 41st World Congress of Vine and Wine (2018), o mercado de vinicultura movimentou em torno de 30 bilhões de euros, decorrentes de uma produção mundial de 249 milhões de hectolitros e um consumo de 244 milhões de hectolitros (unidade de medida padrão utilizada na indústria de bebidas, com o intuito de padronizar o equivalente a um barril) (BLÜEMELHUBER, 2012). Dentre os maiores produtores mundiais de vinho encontramos a Itália, França, Espanha, Estados Unidos, Argentina e Chile. O Brasil se encontra na décima quarta posição com uma produção de 3,6 milhões de hectolitros, sendo o estado do Rio Grande do Sul o responsável por 90% da produção nacional (INTERNATIONAL ORGANISATION OF VINE AND WINE, 2018; MELLO, 2018).

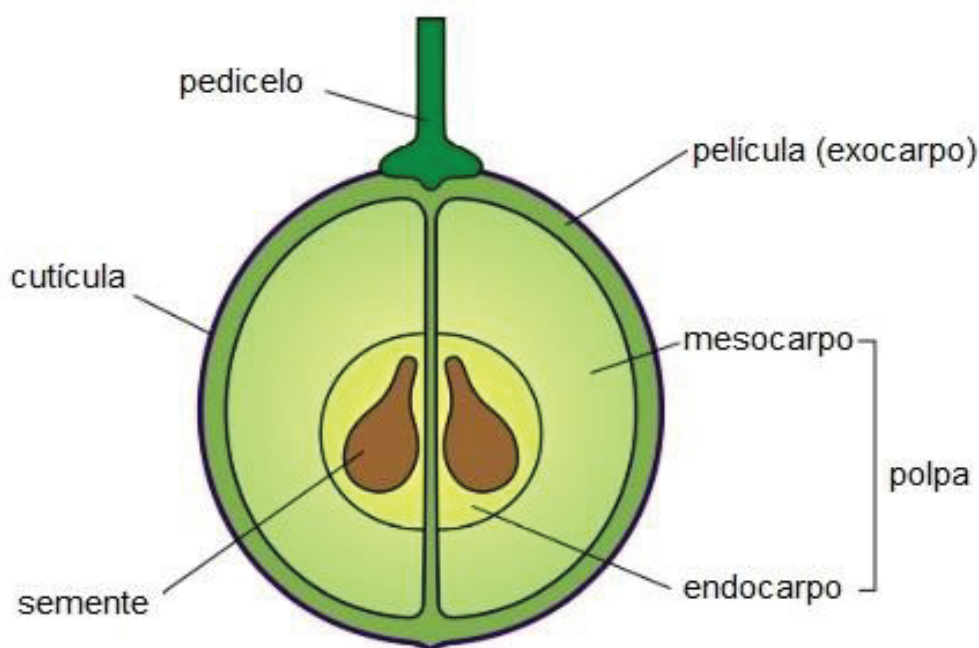
2.1 UVA

Por definição, o vinho é uma bebida resultante do processo fermentativo alcoólico realizado com o mosto de uvas sãs, frescas e maduras (WANSBROUGH *et al.*, 2017). Uvas são frutos oriundos das videiras, classificadas pelo gênero *Vitis* da família das Vitaceae. Mais de 50 espécies são classificadas no gênero *Vitis*, com uma distribuição que ocorre pelos continentes americano, europeu e asiático. Dentre as espécies, a *Vitis vinifera* é a mais comumente utilizada com a finalidade para a produção de vinhos (MCGOVERN; FLEMING; KATZ, 2005; CONDE *et al.*, 2007; JACKSON, 2008; GIACOSA; GERBI; ROLLE, 2019).

2.1.1 Estrutura e constituição da uva

A videira possui uma estrutura de cacho, onde acomoda um número variável de bagas que estão conectadas diretamente à planta por meio dos feixes vasculares de xilema e floema que passam pelo meio do pedicelo e do pedúnculo. A baga de uva madura é formada por uma estrutura (FIGURA 1) que é majoritariamente constituída pela película, polpa e sementes. Outros constituintes presentes são os carboidratos, sais minerais, compostos fenólicos, compostos nitrogenados, ácidos orgânicos e compostos voláteis (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006; CONDE *et al.*, 2007; JACKSON, 2008).

FIGURA 1: ESTRUTURA SECCIONADA DE UMA BAGA DE UVA MADURA.



FONTE: Adaptado de CONDE *et al.* (2007)

A película, casca ou exocarpo pode representar de 8 a 20% da massa da baga, de acordo com a variedade, e é constituída por 11 a 12 camadas de células. As camadas mais internas recebem o nome de hipoderme, enquanto a camada mais externa recebe o nome de epiderme (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006; JACKSON, 2008; KUHN *et al.*, 2014; BORGHEZAN, 2017). As células da epiderme apresentam um formato de disco, com bordas irregularmente onduladas e produzem uma secreção lipídica que envolve toda a superfície da baga. Essa secreção que

impermeabiliza o fruto é chamada de cutícula e desempenha um papel de proteção contra radiação solar e injúrias físicas, barreira contra patógenos e a manutenção dos microrganismos, que é um fator importante para a enologia (CONDE *et al.*, 2007; JACKSON, 2008; BONDADA; KELLER, 2012; BORGHEZAN, 2017).

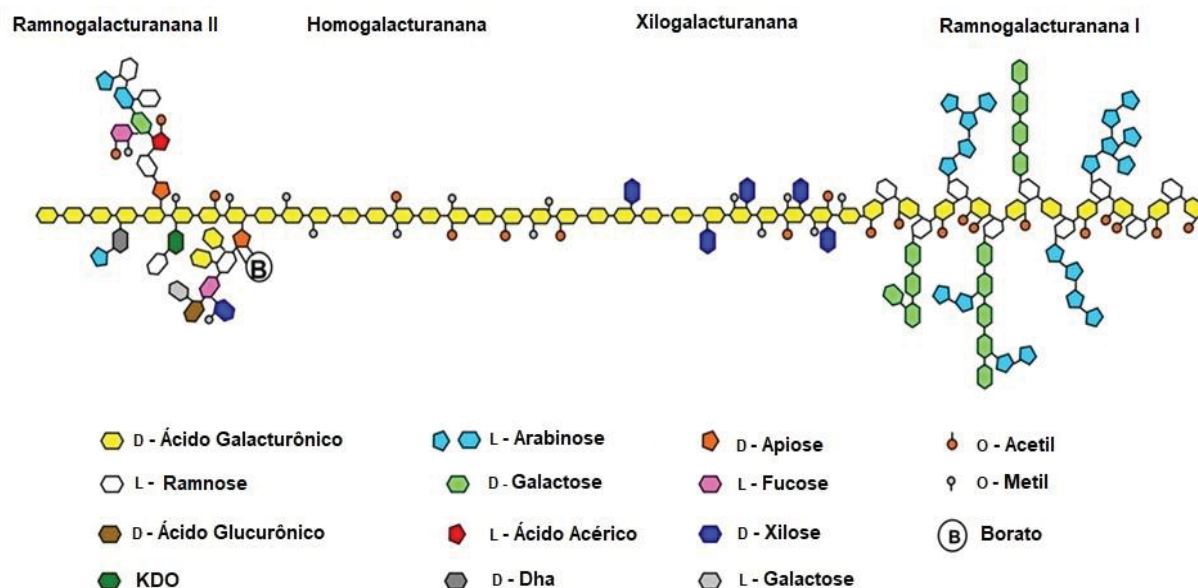
A polpa é formada pelo mesocarpo o endocarpo e água. A água é o componente majoritário, representando de 75 a 85% da polpa e possui um papel importante atuando como solvente dos sais minerais, carboidratos simples e compostos voláteis como o linalol e outros terpenos. O mesocarpo possui entre 25 a 30 camadas de células, enquanto o endocarpo é formado por uma delicada camada que envolve as sementes. As sementes representam uma pequena parcela da massa do fruto, variando de 4,5 a 6% (HARDY, 1970; MARAIS, 1987; COOMBE, 1992; CONDE *et al.*, 2007; KUHN *et al.*, 2014; BORGHEZAN, 2017).

Dentre os carboidratos, a presença majoritária é de frutose e glucose chegando a uma concentração que varia de 150 a 250 g/L no suco do fruto maduro (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006; JACKSON, 2008; SHIRAISHI; FUJISHIMA, 2010; KUHN *et al.*, 2014). Em menor concentração encontramos os polissacarídeos estruturais presentes na constituição da parede celular das células vegetais. Esses polissacarídeos são a celulose, hemicelulose e pectina (HARHOLT; SUTTANGKAKUL; SCHELLER, 2010; APOLINAR-VALIENTE *et al.*, 2015).

A celulose é caracterizada por ser um homopolissacarídeo, não ramificado formado por β -glucose piranosídica (β -Glc_p) com ligações (1 \rightarrow 4). Ela é um dos principais componentes da constituição da parede celular das uvas (HARRIS; SMITH, 2006; APOLINAR-VALIENTE *et al.*, 2015;). Hemiceluloses são heteropolissacarídeos ramificados e de baixa massa molecular. Sua composição é variada e dentre os principais monossacarídeos encontrados temos D-glucose, D-xilose, D-galactose, D-manose, L-arabinose, ácido D-galacturônico, ácido D-glucurônico e ácido 4-O-metil-D-glucurônico. É relatado de forma mais rara a presença de L-fucose, L-ramnose e monossacarídeos neutros metilados. Dentre os polissacarídeos já descritos como hemiceluloses, são relatados as xilanas, arabinoxilanas, xiloglucanas, glucuronoxilanas, arabinogalactanas, galactomananas, glucomananas e mananas (TIMELL; SYRACUSE, 1967; DARVILL *et al.*, 1985; HARRIS; SMITH, 2006). As pectinas (FIGURA 2) apresentam-se na forma de polímeros lineares de ácido galacturônico. Muitas vezes apresentam grupos esterificados de metil e podem estar complexados com cadeias de

ramnogalacturananas, arabinanas e arabinogalactanas (HARRIS; SMITH, 2006; HARHOLT; SUTTANGKAKUL; SCHELLER, 2010; APOLINAR-VALIENTE *et al.*, 2015).

FIGURA 2: ESTRUTURA QUÍMICA DA PECTINA.



FONTE: Adaptado de HARHOLT; SUTTANGKAKUL; SCHELLER (2010).

Dos ácidos orgânicos presentes no fruto, o ácido tartárico e o ácido málico são os que se apresentam em maior quantidade. O ácido málico é o responsável por metade da acidez da uva e do vinho, além de ser um importante indicador para a determinação da data da colheita. Isso se deve a variação da sua concentração no fruto de acordo com o amadurecimento e a temperatura. Frutos mais maduros possuem um menor teor de ácido málico, assim como os frutos que estão se desenvolvendo em temperaturas mais quentes. O ácido tartárico possui uma concentração que varia menos ao decorrer do amadurecimento da baga e é o principal agente utilizado para correção do pH nos vinhos, uma vez que é metabolizado por poucos microrganismos. É relatado que a sua concentração em uvas verdes chega a 15 g/L (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006; CONDE *et al.*, 2007; JACKSON, 2008; BONDADA; KELLER, 2012; BORGHEZAN, 2017).

Os compostos fenólicos são uma classe de moléculas que desempenham um papel fundamental nas características das uvas. Além de serem responsáveis por fornecerem a coloração das uvas tintas, o aroma e o sabor, possuem uma ação inibindo o crescimento de patógenos e fornecem uma adaptação as mudanças

climáticas. Os compostos fenólicos são divididos em flavonoides e não flavonoides. Os flavonoides representam o terceiro grupo mais significativo dos componentes orgânicos presentes nas uvas tintas, sendo as antocianinas e os taninos os seus principais representantes (CHO *et al.*, 2004; CONDE *et al.*, 2007; TEIXEIRA *et al.*, 2013; BORGHEZAN, 2017). Taninos dispõem-se em maior concentração nas sementes, apresentando-se também na porção hipodermal da película. São a classe de moléculas responsáveis pelo sabor adstringente característico dos vinhos. As antocianinas aloca-se na epiderme e camadas mais externas da hipoderme da película, sendo assim as responsáveis pela pigmentação nas uvas tintas. A pigmentação das uvas brancas é decorrente da presença de carotenóides, xantofilas e os flavonóis (CONDE *et al.*, 2007; JACKSON, 2008; TEIXEIRA *et al.*, 2013; KUHN *et al.*, 2014; BORGHEZAN, 2017; ZERBIB *et al.*, 2018).

2.1.2 Microbiologia da baga de uva

A superfície das bagas de uvas hospedam uma diversidade de microrganismos os quais exercem um papel importante para a composição química e as características organolépticas que os vinhos podem vir a ter, pois são eles que irão metabolizar os açúcares e outros compostos presentes na uva em etanol, dióxido de carbono e diversos outros metabólitos que propiciam a particularidade de cada vinho (FLEET, 2003; BARATA; MALFEITO-FERREIRA; LOUREIRO, 2012).

Bactérias e fungos filamentosos (parasitas e saprófitos) representam uma parcela dos microrganismos que ocupam a superfície do fruto. Porém, as leveduras que ocupam a maior parte nas bagas saudáveis, chegando a um número que varia de 10^2 a 10^4 células por grama. Dentre os grupos de leveduras encontrados temos as basidiomicetos oxidativas oligotróficas, ascomicetos oxidativas copiotróficas e as leveduras de fermentação (FLEET, 2003; BARATA; MALFEITO-FERREIRA; LOUREIRO, 2012).

Acredita-se que o resultado da produção do vinho é decorrente de um ecossistema com uma potencial interação levedura-levedura, levedura-fungos filamentosos e levedura-bactérias. Sendo que a composição desses microrganismo é dependente de fatores como as condições climáticas (exposição solar, temperatura, chuva e ventos), tratamentos do vinhedo (composição e manejo do solo ou uso de pesticidas) e fatores biológicos (desde o contato da baga com

animais e as interações entre os microrganismos) (FLEET, 2003; BARATA; MALFEITO-FERREIRA; LOUREIRO, 2012; BORGHEZAN, 2017). Essa variação na microbiota decorrente das condições de cada vinhedo é relatada na literatura como “*terroir* microbiano”, que determina os fatores regionais na variedade das uvas e vinhos (GILBERT; LELIE; ZARRAONAINDIA, 2014).

2.1.3 Uva Cabernet Franc

A espécie *Vitis vinifera* possui diversas variedades, sendo cada uma derivada de acordo com a região que foi produzida inicialmente ou de acordo com o cruzamento de cepas (JACKSON, 2008). Dentre as variedades de *Vitis vinifera*, existe a Cabernet Franc.

Original da região de Bordeaux, na França, é uma uva que apresenta como características uma casca mais fina, bagas bem arredondadas e pequenas, menor acidez, uma menor quantidade de taninos e maior intensidade aromática. É uma casta de uva que resiste muito bem a temperaturas mais frias e possuem um amadurecimento mais precoce do que outras variedades (FULGÊNCIO, 2013; MILAN, 2016).

A Cabernet Franc é muito utilizada para a elaboração de cortes (processo onde se mistura duas ou mais variedades de uva para elaboração de um vinho), adicionando uma maior quantidade de aromas e maciez a bebida final. Além de tintos, é uma variedade de uva que é muito utilizada na França para a elaboração de vinhos rosés (GUERRA *et al.*, 2005; FULGÊNCIO, 2013; MILAN, 2016).

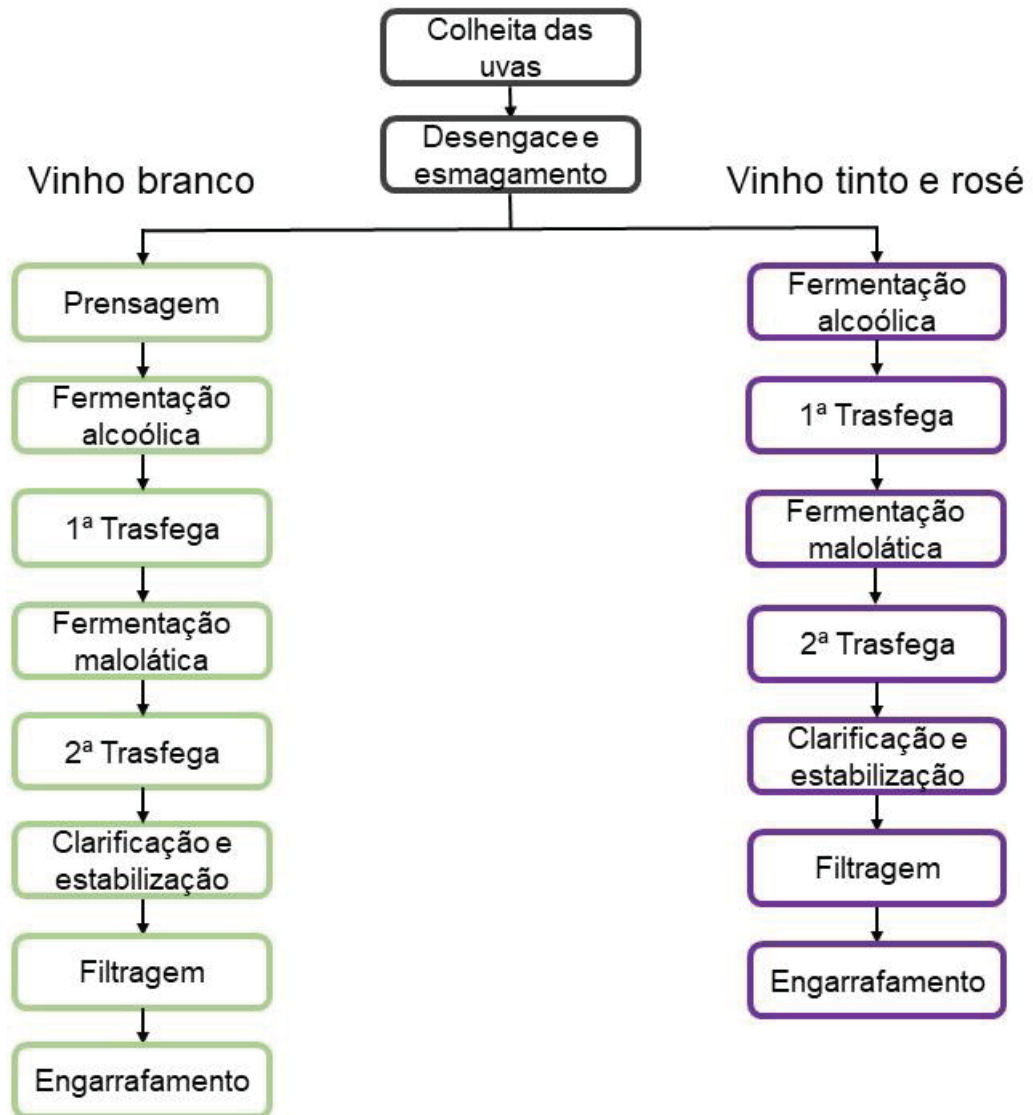
No Brasil, a variedade foi introduzida no ano de 1900, na região do Rio Grande do Sul. Porém, sua maior disseminação aconteceu entre 1970 e 1980, tornando-se a variedade base para a produção de vinhos finos no país. Atualmente, perdeu espaço para outras castas de uva, principalmente para a Cabernet Sauvignon e Merlot (GUERRA *et al.*, 2005).

2.2 PROCESSO DE VINIFICAÇÃO

A vinificação (FIGURA 3) é um conjunto de processos empregados sobre as bagas de uvas maduras para a produção do vinho (GUERRA; SILVA, 2019). Cada classe de vinho passa por um processo de vinificação distinto, para se obter as

propriedades visuais e peculiaridades de cada classe (JACKSON, 2008; WANSBROUGH *et al.*, 2017)

FIGURA 3: FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE VINIFICAÇÃO PARA OS VINHOS BRANCOS, TINTOS E ROSÉS



FONTE: O Autor.

2.2.1 Colheita

A colheita deve ser feita manualmente, com o tempo seco e temperaturas mais amenas (para evitar a oxidação dos frutos). O período da colheita varia de acordo com a variedade da uva e com o seu grau de maturação. Uvas menos maduras tendem a produzir vinhos mais ácidos e com um menor teor alcoólico, isso é decorrente da maior concentração de ácido málico e menor concentração de

açúcares no fruto. Uvas mais maduras possuem uma concentração de ácido tartárico maior que de ácido málico, assim como um teor de açúcar maior. Desse modo, tendem a produzir vinhos menos ácidos e com um teor alcoólico maior (JACKSON, 2008; BEN; MONTEIRO, 2012; BORGHEZAN, 2017; GUERRA; SILVA, 2019). Além do acompanhamento do grau de acidez e de açúcares, a verificação do teor de fenólicos é outro fator importante para saber o momento correto da colheita, uma vez que essas moléculas desempenham um papel importante nas características organolépticas de cada vinho (CONDE *et al.*, 2007; QUIJADA-MORÍN *et al.*, 2012). Assim que as uvas chegam na vinícola elas são pesadas e é determinado o seu grau glucométrico para averiguar o seu potencial alcoólico e realizar possíveis correções (BEN; MONTEIRO, 2012; GUERRA; SILVA, 2019).

2.2.2 Desengace e esmagamento

O desengace consiste no processo que remove as sementes de maneira sutil do restante do fruto e esmaga o engaço sem triturar as cascas. Em vinhos tintos o objetivo do processo é liberar o suco da polpa para entrar em contato com os compostos que irão fornecer a cor desejada a bebida. Nos vinhos brancos é comum utilizarem o processo de desengace sem esmagamento, adicionando-se uma etapa a mais que é a prensagem, onde se separa a casca e sementes do suco (JACKSON, 2008; BEN; MONTEIRO, 2012; GUERRA; SILVA, 2019).

2.2.3 Fermentação alcoólica

Antes da fermentação uma série de processos de correções podem ser realizados no mosto para se obter um vinho com as propriedades desejadas. A primeira é a adição de metabissulfito de potássio, que consiste em ser um sal que libera em solução dióxido de enxofre (SO₂). O SO₂ possui como propriedades no vinho a ação antioxidante, ação anti-séptica contra o crescimento de microrganismos indesejáveis. Um segundo processo é a adição de enzimas pectinolíticas, que atuam no aumento do rendimento do mosto e favorecem os processos futuros de clarificação e filtração. Por fim, a chaptalização se trata da correção na concentração de açúcar para se obter um maior teor alcoólico no produto final (RIZZON;

DALL'AGNOL, 2007; JACKSON, 2008; BEN; MONTEIRO, 2012; GUERRA; SILVA, 2019).

A fermentação pode ser realizada somente com a microbiota que se aloja na superfície da baga de uva. Porém, são recomendados dois processos para uma melhor homogeneidade na fermentação alcoólica. O primeiro é a adição de leveduras ao mosto, sendo que a mais utilizada é a *Saccharomyces cerevisiae*. Essa espécie de levedura possui uma alta capacidade de converter os açúcares em etanol e metabólitos secundários (RIZZON; DALL'AGNOL, 2007; JACKSON, 2008; BEN; MONTEIRO, 2012). É relatado na literatura que a presença da *Saccharomyces cerevisiae* na composição da microbiota natural da uva, quando presente, é em uma frequência muito baixa (BARATA; MALFEITO-FERREIRA; LOUREIRO, 2012). O outro processo que favorece a fermentação é o pé-de-cuba, que consiste em preparar alguns dias antes um mosto de fermentação de 5% a 10% do volume final e adicionar ao fermentador com o restante do mosto (RIZZON; DALL'AGNOL, 2007; JACKSON, 2008; BEN; MONTEIRO, 2012).

Uma vez que o mosto está de acordo com o interesse da vinícola, o processo de fermentação é iniciado. A fermentação alcoólica consiste na conversão dos açúcares presentes na uva em álcool etílico e gás carbônico por intermédio da ação das leveduras e bactérias presentes na superfície da baga ou das leveduras adicionadas no mosto (WANSBROUGH *et al.*, 2017). Podemos dividir o processo de fermentação em duas partes, a fermentação tumultuosa e a lenta. Na fermentação tumultuosa é quando temos a maior atividade das leveduras e o aumento de temperatura. Em vinhos tintos o processo é acompanhado da maceração, que é o contato do mosto de fermentação com as cascas e sementes do fruto, extraíndo os compostos fenólicos, compostos nitrogenados e polissacarídeos para o vinho. Em vinhos brancos esse processo é evitado, pois é durante a maceração que o vinho adquire a sua pigmentação. Vinhos rosés ficam menos tempo em contato com as cascas das bagas de uva durante a maceração (RIZZON; DALL'AGNOL, 2007; JACKSON, 2008; BEN; MONTEIRO, 2012; GUERRA; SILVA, 2019).

A fermentação lenta ocorre logo após a tumultuosa e tem como objetivo liberar todo o dióxido de carbono formado no processo anterior e que as leveduras consumam as últimas gramas de açúcar. Após o término do processo é feito uma trasfega, que é o ato de transferir o vinho para um tanque limpo, sem todos os

resíduos que precipitam no fermentador após o processo (RIZZON; DALL'AGNOL, 2007; JACKSON, 2008; BEN; MONTEIRO, 2012; GUERRA; SILVA, 2019).

2.2.4 Fermentação malolática

Trata-se do processo que visa a conversão do ácido málico em ácido láctico, proporcionando uma menor acidez total do vinho. Os agentes responsáveis por essa conversão são as bactérias lácticas, sendo a *Oenococcus oeni* a maior representante. Além de proporcionar um vinho mais macio e menos ácido, a fermentação malolática é uma forma de tornar o vinho tinto mais estável. O final do processo é marcado pelo despreendimento total do dióxido de carbono e uma segunda trasfega é feita (RIZZON; DALL'AGNOL, 2007; JACKSON, 2008; BEN; MONTEIRO, 2012; GUERRA; SILVA, 2019).

2.2.5 Clarificação, estabilização, filtração e engarrafamento.

Após os processos, o vinho não apresenta a limpidez e a estabilidade de todos os seus compostos para ser conservado de forma correta. A estabilização dos seus componentes ocorre através da precipitação. As proteínas precipitam na presença dos taninos e a estabilização do ácido tartárico com o potássio, que foi adicionado na forma de metabissulfito de potássio, gera o bitartarato de potássio, uma molécula que cristaliza e também precipita no tanque (RIZZON, L. A.; DALL'AGNOL, 2007).

Dentre as alternativas para deixar a bebida mais límpida e estável existem a trasfega (realizada entre os processos de fermentação), a conservação em barris de carvalho (decorrente de uma oxigenação lenta e contínua), diversas filtrações e refrigeração (RIZZON; DALL'AGNOL, 2007; BEN; MONTEIRO, 2012).

O engarrafamento é feito normalmente em garrafas de 750 mL, com rolhas de cortiça. Alguns vinhos podem passar pelo processo de envelhecimento na garrafa, caso não seja o caso a bebida está pronta para o comércio ou consumo (RIZZON; DALL'AGNOL, 2007; BEN; MONTEIRO, 2012).

2.3 CLASSIFICAÇÃO DOS VINHOS

Vinho é uma bebida complexa, resultante de uma porção de processos que partem da baga da uva e da atividade biológica de diversos microrganismos até chegar ao produto final engarrafado. Cada vinho possui características específicas, de tal maneira que, no Brasil, são classificados de acordo com a sua classe, cor e teor de açúcar (GUERRA *et al.*, 2005).

Referente a classe, temos os vinhos de mesa, os leves, os espumantes, os gaseificados, os licorosos e os compostos. Nos vinhos de mesa possuímos os vinhos finos, que são elaborados mediante processos tecnológicos que asseguram a otimização de suas características sensoriais e utilizam exclusivamente as uvas de variedades *Vitis vinifera* do grupo Nobres (definidas por regulamento), os vinhos de mesa de viníferas são os elaborados exclusivamente com uvas de variedades *Vitis vinifera* e os vinhos de mesa de americanas que são constituídos com o grupo de uvas americanas/híbridas que podem conter vinhos com a variedade *Vitis vinifera* (GUERRA *et al.*, 2005; JACKSON, 2008).

Enquanto a cor, os vinhos são classificados em tinto, branco e rosé. Vinhos tintos são formados pela utilização de uvas tintas e um longo contato com as cascas da fruta durante o processo de fermentação. Vinhos brancos utilizam uvas brancas ou uvas tintas sem as cascas no processo. Os vinhos rosé podem ser feitos de duas formas, a primeira deixando um menor período de tempo o contato com as cascas das uvas durante a maceração que acontece no processo de fermentação alcoólica ou pelo corte, que se trata de uma mistura entre vinhos. No caso do rosé utilizando uma mistura entre variedades brancas e tintas para se obter a pigmentação desejada (GUERRA *et al.*, 2005; RIZZON, L. A.; DALL'AGNOL, 2007; JACKSON, 2008).

A classificação baseada no teor de açúcar é expressa de acordo com g/L de glucose no produto final. Vinhos secos possuem até 4 g/L de açúcar, enquanto os meio-secos possuem um teor que varia de 4 g/L até 25 g/L de açúcar. Os vinhos suaves ou doces, apresentam uma concentração de açúcar superior a 25 g/L e inferior a 80 g/L (GUERRA *et al.*, 2005).

2.4 CONSTITUIÇÃO DOS VINHOS

A constituição do vinho o torna uma bebida complexa, onde é apresentado uma diversidade de moléculas resultantes do metabolismo da fermentação. Como principal produto do processo temos a presença do álcool etílico e as macromoléculas e moléculas presentes são os compostos fenólicos, carboidratos, compostos nitrogenados e ácidos orgânicos (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006; MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009; CHEYNIER *et al.*, 2010; MARTÍNEZ-LAPUENTE *et al.*, 2015).

2.4.1 Compostos fenólicos, compostos nitrogenados e ácidos orgânicos

São a classe de moléculas que desempenham um papel fundamental na enologia, sendo responsáveis pela aparência, aroma, sabor, adstringência e atividade antimicrobiana característica de vinhos tintos (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006; JACKSON, 2008; MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009; CHEYNIER *et al.*, 2010).

Compostos fenólicos não flavonoides presentes nos vinhos são moléculas derivadas dos ácidos hidroxicinâmico e hidroxibenzóico. Na uva o ácido hidroxicinâmico encontra-se complexado com ácido tartárico, enquanto no vinho ambos os ácidos são identificados na forma livre. Além disso, o ácido hidroxicinâmico é o composto fenólico mais abundante em vinhos brancos, desempenhando um papel na coloração da bebida (KENNEDY; SAUCIER; GLORIES, 2006; JACKSON, 2008). Outra molécula dessa classe presente no vinho é o resveratrol, onde estudos associam o seu consumo a uma série de benefícios à saúde do indivíduo (CONDE *et al.*, 2007; WEISKIRCHEN; WEISKIRCHEN, 2016).

Os flavonoides pertencem a uma parte mais significativa dos compostos fenólicos presentes no vinho. Dentre as moléculas que os representam as principais são antocianinas e as proantocianinas (CONDE *et al.*, 2007; TEIXEIRA *et al.*, 2013).

Antocianinas são as moléculas responsáveis pela pigmentação nos vinhos tintos e rosés. Durante a maceração na fermentação alcoólica e até alguns anos de maturação, as antocianinas sofrem uma diversidade de reações e associações formando novos pigmentos e consequentemente contribuindo para uma maior estabilidade na cor da bebida (KENNEDY; SAUCIER; GLORIES, 2006;

GABRIELIAN; KAZUMIAN, 2018). Antocianinas no vinho são encontradas associadas covalentemente com algum glicosídeo, sendo a malvidina-3-O-glicosídeo a molécula mais abundante (RIBÉREAU-GAYON, 1959; CONDE *et al.*, 2007). Por fim, estudos relatam uma associação entre a presença das antocianinas como fator protetor contra as doenças cardiovasculares (MAZZA, 2007; RODRIGO; MIRANDA; VERGARA, 2011; WALLACE, 2011).

Proantocianinas, também conhecidas como os taninos, são polímeros de flavan-3-ol e é a classe de moléculas responsável pelo amargor e adstringência característica do vinho (CONDE *et al.*, 2007; QUIJADA-MORÍN *et al.*, 2012). É relatado que o maior o tempo de fermentação, temperaturas mais altas e o maior teor alcoólico são fatores que aumentam as concentrações de flavan-3-ol e proantocianinas no vinho. As catequinas e epicatequinas são exemplos de flavan-3-óis presentes no vinho (KENNEDY; SAUCIER; GLORIES, 2006). O consumo das catequinas e proantocianinas presentes no vinho são associados a efeitos anti-aterogênicos e anti-inflamatórios, também auxiliando o sistema cardiovascular (AVIRAM; FUHRMAN, 2002; FUHRMAN; AVIRAM, 2002; RODRIGO; MIRANDA; VERGARA, 2011).

Além dos ácidos tartárico e málico oriundos das bagas de uva, são encontrados no vinho os ácidos láctico, acético e succínico. O ácido láctico é o principal produto da fermentação malolática, realizada pelas bactérias lácticas. O processo metabólico consiste da descarboxilação do ácido málico, formando assim o ácido láctico. O ácido málico por ser dicarboxílico fornece um sabor mais ácido a bebida, com sua conversão em uma estrutura monocarboxílica a bebida possui um paladar mais suave. (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006; RIZZON; DALL'AGNOL, 2007; JACKSON, 2008; MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009; CHEYNIER *et al.*, 2010).

O ácido acético é produzido em pequenas quantidades pelas leveduras durante a fermentação alcoólica. Níveis normais no vinho ficam na faixa de 300 mg/L. Nessa faixa o ácido acético desempenha um papel na formação de ésteres de acetato que podem fornecer uma complexidade e caráter frutado a bebida. Níveis superiores a 300 mg/L são associados a contaminação e alteram de forma negativa o sabor e aroma do vinho (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006; JACKSON, 2008; MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009; CHEYNIER *et al.*, 2010).

O ácido succínico é um dos subprodutos mais comuns decorrentes do metabolismo das leveduras, além de ser resistente a degradação microbiana em

condição anaeróbica e ser estável no vinho. O ácido succínico apresenta um sabor amargo e salgado, sua quantidade no vinho acentua o seu sabor e contribui com o seu caráter vínico (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006; JACKSON, 2008; MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009; CHEYNIER *et al.*, 2010).

O nitrogênio encontra-se presente no vinho tanto na forma mineral quanto na forma orgânica. Os níveis encontrados são diferentes entre os vinhos brancos e tintos, sendo que a média de 185 mg/L e 330 mg/L, respectivamente. Nitrogênio mineral está em grande parte na forma de sal de amônia, enquanto na fase orgânica é encontrado basicamente em aminoácidos, peptídeos e proteínas (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006; JACKSON, 2008; MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009; CHEYNIER *et al.*, 2010).

2.4.2 Polissacarídeos presentes no vinho

Os carboidratos que estão presentes nos vinhos têm sua principal origem do próprio fruto da uva. As leveduras, bactérias e fungos que participam do processo de vinificação também contribuem com o teor desses carboidratos. A maior parte dessas macromoléculas é constituída de polissacarídeos (JACKSON, 2008).

Polissacarídeos atuam na estabilização química do vinho, prevenindo a agregação de moléculas, floculação ou precipitação. Além disso, modulam as características organolépticas da bebida por meio da interação com os compostos fenólicos (PELLERIN; CABANIS, 1998; RIOU *et al.*, 2002; VIDAL *et al.*, 2004; QUIJADA-MORÍN *et al.*, 2012, 2014). Para a enologia os polissacarídeos de maior importância são os provenientes das uvas e leveduras. Das bagas de uva, os polissacarídeos de maior relevância são os de origem péctica, uma vez que a celulose é muito insolúvel para ser extraída da baga de uva e a hemicelulose é pouco solúvel, precipitando no tanque durante os processos de fermentação (JACKSON, 2008).

As bagas de uva fornecem ao vinho os polissacarídeos ricos em arabinose e galactose representados pelas arabinanas e arabinogalactanas-proteínas do tipo II (AG-II), as ramnogalacturonanas do tipo I (RG-I) e tipo II (RG-II) e as homogalacturonanas (HG) (PELLERIN *et al.*, 1995, 1996; DOCO *et al.*, 1997; VIDAL *et al.*, 2000, 2003; MARTÍNEZ-LAPUENTE *et al.*, 2013).

Arabinanas são caracterizadas como homopolissacarídeos com ramificações. A cadeia principal é composta por α -L-arabinoses furanosídicas (α -L-Araf) ligadas (1 \rightarrow 5) e os pontos de ramificações acontecendo em O-3 (ASPINALL, 1980).

Arabinogalactanas (AGs) se apresentam por uma cadeia principal de β -D-galactose piranosídica (β -D-Galp) com até 25% das cadeias laterais constituídas por α -L-Araf. Existem dois tipos de arabinogalactanas. As do tipo I são formadas por (1 \rightarrow 4)- β -D-Galp com as poucas ramificações de α -L-Araf ocorrendo na posição O-3 das galactoses. Arabinogalactanas do tipo II são as relatadas em vinhos, onde a cadeia principal é formada por (1 \rightarrow 3)- β -D-Galp, com ramificações de (1 \rightarrow 6)- β -D-Galp em O-6 e em O-3 a presença de α -L-Araf formando terminais não redutores (ASPINALL, 1980; CARPITA; GIBEAUT, 1993; PELLERIN *et al.*, 1995).

Homogalacturananas representam 65% da estrutura da pectina. Por definição são polissacarídeos formados por uma cadeia linear de ácidos α -D-galacturônicos com ligações (1 \rightarrow 4). É característico que a estrutura apresente grupamentos de metil ester ligados na carboxila em C-6 e/ou grupamentos O-acetilados nas posições O-2 ou O-3 (ASPINALL, 1980; HARHOLT; SUTTANGKAKUL; SCHELLER, 2010).

Ramnogalacturananas também se apresentam em dois grupos. Ramnogalacturananas do tipo I (RG-I) são heteropolissacarídeos que apresentam sua estrutura de cadeia por meio da repetição de dissacarídeos formados por (1 \rightarrow 2)- α -L-ramnose e ácidos (1 \rightarrow 4)- α -D-galacturônicos. O monossacarídeo de L-ramnose desempenha o papel de interromper as longas cadeias de ácidos galacturônicos e atua como ponto de ramificação e interação com as arabinanas, galactanas e arabinogalactanas. Outro papel desempenhado é a alteração na conformação da estrutura da pectina, onde a presença dos resíduos de L-ramnose proporciona uma dobra na cadeia. É relatado a presença de grupamentos acetil nas regiões O-3 dos ácidos galacturônicos (ASPINALL, 1980; CARPITA; GIBEAUT, 1993; CROS *et al.*, 1996; HARHOLT; SUTTANGKAKUL; SCHELLER, 2010).

Na estrutura das ramnogalacturananas do tipo II (RG-II) é relatado uma diversidade de monossacarídeos e ramificações. A cadeia principal é constituída por (1 \rightarrow 4)- α -D-GalpA e as cadeias laterais são compostas por 12 monossacarídeos ligados entre si por 22 ligações glicosídicas distintas. Na composição das cadeias

laterais da RG-II é relatado a presença de D-apiose, 2-O-metil-D-xilose e 2-O-metil-D-fucose, que são monossacarídeos raros e encontrados somente na estrutura de vegetais. RG-II representam uma menor parte na estrutura da pectina, porém apresenta uma estrutura muito conservada e por esses motivos autores sugerem que seja uma molécula importante na sinalização celular (ASPINALL, 1980; CARPITA; GIBEAUT, 1993; HARHOLT; SUTTANGKAKUL; SCHELLER, 2010). Nos vinhos, RG-I e RG-II desempenham um papel na estabilização do ácido tartárico, acelerando a cristalização em baixas concentrações e a inibindo quando atinge concentrações elevadas.

Os polissacarídeos oriundos das leveduras são o outro grupo de carboidratos importantes para os aspectos sensoriais e característicos dos vinhos. Decorrentes da liberação pelas leveduras ou pela ação enzimática após a sua autólise, os principais polissacarídeos oriundos são as mananas, glucanas e as manoproteínas (GONÇALVES *et al.*, 2002; VIDAL *et al.*, 2003; MARTÍNEZ-LAPUENTE *et al.*, 2013). A parede celular das leveduras é constituída em sua maior parte pelas manoproteínas e por (1→3)-β-D-glucose com ramificações em O-6 (LIPKE; OVALLE, 1998).

As manoproteínas são polipeptídeos altamente glicosilados, apresentando de 50% a 95% de sua massa em carboidratos. Nos vinhos, autores relatam uma estrutura contendo D-manose com a maioria das ligações glicosídicas em α-(1→2), α-(1→3) e α-(1→2,6) (LIPKE; OVALLE, 1998; DUPIN *et al.*, 2000; GONÇALVES *et al.*, 2002). Durante o processo de vinificação, as manoproteínas desempenham um papel no efeito positivo na espuma, contribuem com a floculação das cepas de algumas leveduras e funcionam como marcadores do processo de autólise (MARTÍNEZ-LAPUENTE *et al.*, 2013, 2015).

Mananas, arabinogalactana do tipo II e ramnogalacturanana do tipo II foram os polissacarídeos caracterizados em um vinho carbenet franc. Esses polissacarídeos apresentaram efeitos antitumorais em testes *in vivo* realizados em ratos com tumor Walker-256 e efeitos anti-inflamatórios em testes *in vitro* sobre macrófagos RAW 264.7 de camundogos (STIPP *et al.*, 2017; BEZERRA *et al.*, 2018).

2.4.3 Oligossacarídeos presentes nos vinhos

Os primeiros oligossacarídeos evidenciados no vinho foram os dissacarídeos: sacarose, trealose, melibiose e maltose. A sacarose é o dissacarídeo mais importante para o processo de fermentação alcoólica, sendo o principal açúcar utilizado na chaptalização devido ao seu baixo custo e pureza. As leveduras consomem toda a sacarose durante a fermentação alcoólica. Por esse motivo, a sua presença na bebida é sinal de alguma adição irregular após o processo. Trealose é um dissacarídeo que não se encontra inicialmente no mosto, porém marca o final da fermentação junto com alguns polissacarídeos oriundos de leveduras, devido a autólise (DOCO *et al.*, 1997; RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006).

Posteriormente, foi relatada a presença de cadeias curtas de ácidos galacturônicos que possuíam sua origem da degradação de homogalacturananas (PELLERIN; CABANIS, 1998). Em vinhos Merlot e Carignan foram identificados 4-O-metil-oligo-glucuronoxilanas, decorrentes da degradação enzimática da hemicelulose das bagas de uva (DUCASSE *et al.*, 2010), enquanto em vinhos Grignolino e Chardonnay foram identificados oligossacarídeos de galactanas, xiloglucanas e arabinogalactanas (BORDIGA *et al.*, 2012). Oligossacarídeos provenientes das manoproteínas, das arabinogalactanas, ramnogalacturananas, xilanas, glucanas e homogalacturananas foram identificados em diferentes proporções em vinhos Monastrell, Syra e Cabernet Sauvignon (MATSUHIRO *et al.*, 2009; APOLINAR-VALIENTE *et al.*, 2014, 2015b). Trabalhos relatam a composição dos oligossacarídeos presentes nos espumantes das variedades Tempranillo e Verdejo (MARTÍNEZ-LAPUENTE *et al.*, 2016, 2018).

Os oligossacarídeos também auxiliam na estabilização de moléculas presentes no vinho, atuando como quelantes de cátions divalentes e interagindo com os compostos fenólicos (CESCUTTI; RIZZO, 2001; JACKSON, 2008).

Oligossacarídeos provenientes de pectinas são relacionados com diversas atividades biológicas, sendo desde o auxílio na autodefesa de plantas, assim como atividade antioxidante, antibacteriana e atuação contra o câncer de cólon (DARVILL; ALBERSHEIM, 1984; OTAKA, 2006; LAMA-MUÑOZ *et al.*, 2012; CHAARI *et al.*, 2015).

Os trabalhos de caracterização dos oligossacarídeos presentes em vinhos majoritariamente utilizam a espectrometria de massas, sendo poucos trabalhos

relatados na literatura que utilizam da técnica de ressonância magnética nuclear (RMN) para a caracterização dessas moléculas.

Dada importância do vinho em um contexto mundial, a busca em caracterizar os oligossacarídeos presentes na sua composição e as atividades biológicas que os oligossacarídeos apresentam e que foram citadas anteriormente, o presente estudo utiliza como modelo para caracterização dos seus oligossacarídeos um vinho da variedade Cabernet Franc.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Extrair, isolar e caracterizar os oligossacarídeos da fração solúvel presentes no vinho da variedade Cabernet Franc.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair os oligossacarídeos presentes em um vinho fino nacional da variedade Carbernet Franc.
- Purificar os oligossacarídeos através de partições líquido-líquido com solventes orgânicos e cromatografia de adsorção em coluna aberta com carvão ativado-celite utilizando um gradiente de H₂O:EtOH como fase móvel.
- Caracterizar as estruturas dos oligossacarídeos através das análises espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Espectrometria de Massas e cromatografia de camada delgada (TLC) aliadas a estratégias de modificações químicas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL DE ESTUDO

Para o presente estudo foram selecionadas duas garrafas (1500 mL) de um vinho fino nacional da variedade de uva Cabernet Franc. A bebida foi produzida através de uvas cultivadas na região da Serra Gaúcha no estado do Rio Grande do Sul com safra datada no ano de 2017.

4.2 OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS OLIGOSSACARÍDEOS

4.2.1 Extração dos oligossacarídeos pelo sobrenadante da precipitação etanólica

O vinho foi concentrado com o auxílio de um rotaevaporador com pressão reduzida a uma temperatura de 60 °C e submetido a precipitação etanólica *overnight* dos seus polissacarídeos com etanol gelado (3 volumes), seguido de centrifugação (8000 rpm, 4 °C por 20 minutos). O sobrenadante etanólico foi concentrado em rotaevaporador com pressão reduzida a uma temperatura de 60 °C.

4.2.2 Purificação dos oligossacarídeos

O sobrenadante concentrado com 117,78 g foi submetido a duas partições com 120 mL de acetato de etila e duas partições com 120 mL de *n*-butanol, respectivamente. O intuito dessa etapa era a remoção dos compostos fenólicos presentes na amostra. Logo em seguida, a fase aquosa da amostra foi submetida a uma cromatografia com fase estacionária de carvão ativado e celite (1:1) e como fase móvel um gradiente de H₂O:EtOH. O gradiente iniciou em 100:0 e foi passando para 95:5, 90:10, 85:15 e 80:20, uma vez que foi verificado que frações superiores de etanol não apresentavam relevância na eluição dos oligossacarídeos da amostra (MORALES *et al.*, 2006; KUHN *et al.*, 2014b; SOARES, 2017). A eluição dos oligossacarídeos foi acompanhada até o teste de fenol sulfúrico ficar negativo (100 µL de amostra, 0,5 mL de fenol 5% e 2,5 mL de H₂SO₄ 95%-97%) (DUBOIS *et al.*, 1956). Os oligossacarídeos foram coletados nas frações etanólicas. As frações

foram agrupadas e concentradas em rotaevaporador com pressão reduzida a uma temperatura de 60 °C, congeladas e liofilizadas.

4.3 ANÁLISE ESTRUTURAL E CARACTERIZAÇÃO DOS OLIGOSSACARÍDEOS

4.3.1 Análise da composição monossacarídica

Com o intuito de aumentar a eficiência do processo, uma vez que os oligossacarídeos apresentam resíduos ácidos resistentes à hidrólise, 5 mg de oligossacarídeos da amostra integral foram inicialmente submetidos a uma metanólise utilizando 600 µL de uma solução 0,5 M de MeOH/HCl a 80 °C por 16 horas. A metanólise foi interrompida com a adição de água e o material foi seco no Reacti-Vap a temperatura ambiente. Em seguida o material foi submetido a uma hidrólise, para remover os grupos metis inseridos pela metanólise, utilizando 500 µL de uma solução 0,5 M de ácido trifluoroacético (TFA) a 100 °C por 4 horas. Material foi seco e submetido a análises por cromatografia de camada delgada (TLC) e ressonância magnética nuclear (RMN).

A TLC foi executada em placas de sílica-gel 60 G (MERK) com 10 cm de altura. A fase móvel utilizada foi uma mistura de acetato de etila:*n*-propanol:ácido acético:água em uma proporção de 4:2:2:1. A placa foi revelada aplicando-se uma solução de orcinol:ácido sulfúrico (constituída por 0,2 g de orcinol em 5 mL de H₂SO₄ e 95 mL de etanol) (BRUCKNER, 1955; SASSAKI *et al.*, 2008).

A composição monossacarídica foi realizada por meio do cálculo das integrais das áreas dos picos no espectro de RMN 1D de ¹H. A mutarrotação dos monossacarídeos foi considerada para encontrar a porcentagem de cada monossacarídeo na mistura (SASSAKI *et al.*, 2014). As análises foram realizadas em um equipamento de RMN operando a 14,1 Tesla (600.13 MHz para ¹H) (Bruker Avance III, Bilerica, Massachusetts, EUA) equipado com uma sonda inversa de 5 mm TCI Prodigy com gradiente de campo no eixo z a uma temperatura de 10 °C, com o intuito de deslocar o sinal da água para melhor visualização dos sinais no espectro.

4.3.2 Redução dos terminais redutores dos oligossacarídeos com Borohidreto de Sódio (NaBH_4)

A amostra integral (todas as frações etanólicas após cromatografia de carvão ativado – celite juntas), assim como as frações etanólicas separadas foram reduzidas com borohidreto de sódio (NaBH_4) por 90 minutos. Após o processo, as amostras foram passadas em resina catiônica para a remoção dos sais, o pH foi neutralizado com LiOH (para futuras análises em espectrometria de massas) e liofilizadas (WOLFROM; THOMPSON, 1963a).

4.3.3 Oxidação com metaperiodato de sódio (NaIO_4)

A oxidação com metaperiodato de sódio foi realizada de acordo com o protocolo de PANG *et al.* (2007) com algumas modificações. 13 mg de oligossacarídeos foram solubilizados em uma solução de 25 mL a 0,015 M de NaIO_4 . As amostras foram mantidas abrigadas da luz por 120 horas em temperatura ambiente. A reação foi interrompida adicionando 1 mL de etileno glicol. O material foi reduzido com 10 mg de NaBH_4 por 12 horas em temperatura ambiente. A amostra foi submetida a troca em resina catiônica e em seguida por uma resina aniônica para a remoção dos sais. O etileno glicol foi removido com o auxílio de cromatografia utilizando carvão ativado-celite (1:1), com um gradiente de $\text{H}_2\text{O}:\text{EtOH}$ (100:0, 95:5, 90:10, 85:15 e 80:20). As frações etanólicas foram agrupadas em uma única fração. Essa fração foi concentrada, liofilizada, em seguida solubilizada em 500 μL de D_2O e submetida a análises por RMN.

4.3.4 Análise estrutural por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises de RMN foram realizadas com a amostra integral de oligossacarídeos (reduzidos e não reduzidos) e com os oligossacarídeos reduzidos presentes nas frações etanólicas separadas. As análises com as amostras na forma integral foram feitas com 20 mg solubilizados em 500 μL de D_2O e 20 μL de trimetilsilil propionato de sódio deuterado ($\text{TMSP-2,2,3,3-}d_4$).

As análises foram realizadas através do espectrômetro de ressonância magnética nuclear operando a 14,1 Tesla (600.13 MHz para ^1H) (Bruker Avance III,

Billerica, Massachusetts, EUA) equipado com uma sonda inversa de 5 mm do tipo QXI com gradiente de campo no eixo z a uma temperatura de 30 °C. Os espectros de RMN 1D de ^1H foram coletados depois do pulso de calibração de 90°. Os deslocamentos químicos do ^1H e ^{13}C foram determinados por experimentos 2D de RMN. O mapa de correlação 2D $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC editado foi adquirido empregando a sequência de pulso *hsqcedetgpsisp2.2*, utilizando janelas 10,6541 x 79,9984 ppm, delay de 1,080 s, com 32 varreduras por série em uma matriz de 2048 x 160. com zero *filling* em F1 (2048), antes da transformada de Fourier (SASSAKI *et al.*, 2014).

Os mapas de correlação heteronuclear a longa distância 2D $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ de HMBC foram realizados utilizando uma sonda inversa de 5 mm TCI Prodigy com gradiente de campo no eixo z. A aquisição foi mediante a sequência de pulso *hmbcgplpndqf* com uma janela espectral de 13,0180 x 219,9978 ppm, um total de 8 varreduras por série de pontos de dados na matriz de 2048 x 256. Os mapas de correlação homonuclear 2D $^1\text{H}/^1\text{H}$ do tipo TOCSY foram adquiridos utilizando a sequência de pulso *mlevphpr.2*. A janela de aquisição foi de 10,0138 x 10,0138 ppm. Foram feitas com 8 varreduras por série de pontos de dados na matriz 2048 x 256. O processamento dos dados obtidos nos experimentos foi realizado utilizando o software Topspin versão 3.5 (Bruker).

4.3.5 Análise estrutural por Espectrometria de Massas

As análises foram executadas com a amostra integral de oligossacarídeos que foi reduzida com NaBH_4 . 250 µg de cada amostra foi solubilizado em $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (70:30, v/v) com LiCl (1 mM).

As análises de espectrometria de massas foram realizadas através de infusão direta no espectrômetro de massas de alta resolução MicrOTOF-Q II^R (Bruker Daltonics, Billerica, EUA) equipado com uma fonte de ionização ortogonal por *eletrospray*. A faixa de massas selecionadas foi de 100-1200 m/z com aquisição de um espectro por segundo com o equipamento operando no modo positivo. A voltagem do capilar foi de 4500 V e o deslocamento de platina final foi de 500 V. O fluxo de gás nebulizador for de 0,6 bar e o gás de secagem utilizado foi o nitrogênio a um fluxo de 6,0 L/min a 180 °C. O equipamento foi calibrado utilizando uma solução de formiato de sódio (10 mM) com um escore de calibração de 99%. O fluxo volumétrico da amostra na infusão foi de 180 µL/h. A energia de colisão para a

fragmentação variou de 10.0 eV até 55 eV. Os espectros gerados foram analisados utilizando a versão 4.1 do software DataAnalysis – Bruker.

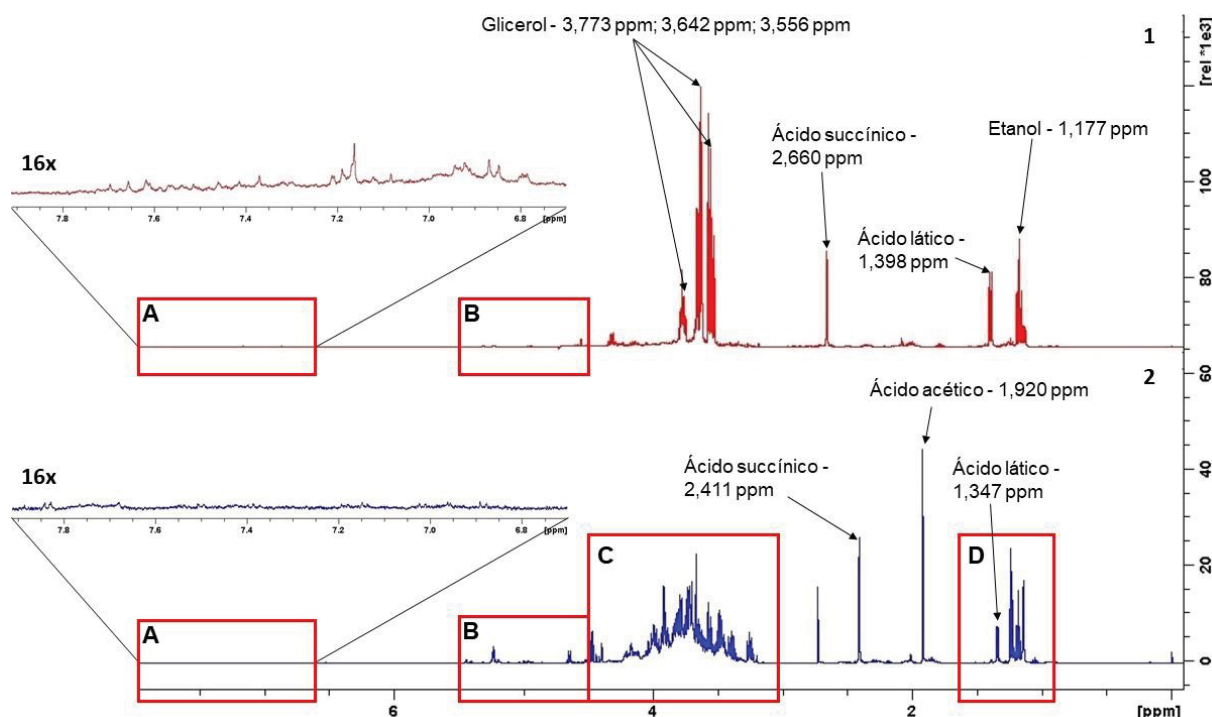
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO

Após ser concentrado, o sobrenadante etanólico apresentou uma massa de 117,78 g. Os tratamentos com solventes orgânicos obtiveram sucesso em remover os compostos fenólicos, uma vez que os sinais na região de 6,85 a 8,00 ppm no espectro de 1D ^1H de RMN da amostra sem purificação (FIGURA 4.1) se extinguíram após o processo (FIGURA 4.2). Essa é a região que os deslocamentos químicos característicos de hidrogênios dos anéis aromáticos dos polifenóis presentes no vinho são atribuídos (MATEUS *et al.*, 2003, 2004; CALA *et al.*, 2010).

Após as partições com acetato de etila e butanol, a fase orgânica foi separada e armazenada, enquanto a fase aquosa foi aplicada na coluna de cromatografia com fase estacionária de carvão ativado-celite. Foi verificado com ensaios qualitativos de fenol sulfúrico que o volume de 100 mL para cada fração pré-estabelecida do gradiente de $\text{H}_2\text{O}:\text{EtOH}$ era efetivo para a eluição dos oligossacarídeos da coluna, sem deixar algum material retido. Após o gradiente de, $\text{H}_2\text{O}:\text{EtOH}$, as frações etanólicas (95:5, 90:10, 85:15 e 80:20) foram aglomeradas em uma única fração, denominada amostra integral. Como rendimento de oligossacarídeos, foi obtido o equivalente a 0,2% do conteúdo de uma garrafa de vinho. A cromatografia foi eficiente ao eliminar o glicerol presente na fase aquosa das amostras. Essa conclusão é decorrente de não ser possível visualizar os sinais característicos dessa molécula em 3,773 ppm, 3,642 ppm e 3,556 ppm no espectro de RMN 1D ^1H (FIGURA 4b) (WISHART *et al.*, 2018). O glicerol é uma molécula presente no vinho, pois é um dos metabólitos secundários do processo de fermentação alcoólica (JACKSON, 2008).

FIGURA 4: 1: ESPECTRO DE RMN 1D ^1H DOS OLIGOSSACARÍDEOS PRESENTES NO VINHO CABERNET FRANC ANTES DOS PROCEDIMENTOS DE PURIFICAÇÃO. 2: ESPECTRO DE RMN 1D ^1H DOS OLIGOSSACARÍDEOS PRESENTES NO VINHO CABERNET FRANC APÓS OS PROCEDIMENTOS DE PURIFICAÇÃO. REGIÃO DE FENÓLICOS (δ 6,85 – 8,00) AUMENTADA 16x. AMBAS AS AMOSTRAS FORAM SOLUBILIZADAS EM D_2O A 30 °C COM REFERÊNCIA O TMSP-2,2,3,3- d_4 . A: REGIÃO DE COMPOSTO FENÓLICOS; B: REGIÃO ANOMÉRICA; C: REGIÃO DOS CARBONOS C2-C6; D: REGIÃO DE DEOXY E ACETIL.



5.2 COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA

Parte da amostra integral foi submetida a duas etapas de hidrólise (metanólise e hidrólise com TFA) para aumentar a eficiência do processo. Após o processo, a cromatografia de camada delgada foi realizada (FIGURA 5). Pela TLC é indicado a presença dos monossacarídeos glucose, manose, galactose e arabinose. Na região dos ácidos urônicos é visível um arraste, indicando uma possível presença desses monossacarídeos. Uma banda leve é compatível com a presença de xilose.

A análise dos espectros 1D de ^1H RMN (FIGURA 6) indica a presença de deslocamentos químicos referentes a $\alpha\beta$ -galactose (δ 5,26 e δ 4,59), $\alpha\beta$ -glucose (δ 5,23 e δ 4,65), $\alpha\beta$ -xilose (δ 5,20 e δ 4,58), α -manose (δ 5,18), α -ramnose (δ 5,11), ácido β -glucurônico (δ 4,70), ácido β -galacturônico (δ 4,62) e β -arabinose (δ 4,52) (SASSAKI *et al.*, 2014). A confirmação dos sinais visualizados no espectro 1D de ^1H

é feita através do mapa de correlação 2D $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC (FIGURA 7). Uma vez calculado a integral da área de uma das configurações mutarrotacionais de cada monossacarídeo e sabendo a porcentagem que cada configuração da mutarrotação tem no equilíbrio, obteve-se a composição monossacarídica demonstrada na Tabela 1.

A variedade da composição dos monossacarídeos presentes demonstra a diversidade que os oligossacarídeos presentes no vinho Cabernet Franc apresentam. A presença da glucose como monossacarídeo majoritário também é relatada nos vinhos Grignolino, Chardonnay e Syra (APOLINAR-VALIENTE *et al.*, 2015b; BORDIGA *et al.*, 2012). Os outros monossacarídeos encontrados também são relatados na literatura dos oligossacarídeos de vinhos. A fucose não foi detectada, uma vez que sua presença também é mínima na composição de outros vinhos. Parte da porcentagem dos ácidos urônicos detectados, pode apresentar algumas unidades com um grupo O-Metil. Uma vez que o monossacarídeo ácido 4-O-metil-glucurônico é comumente encontrado na composição dos oligossacarídeos presentes no vinho (MATSUHIRO *et al.*, 2009; DUCASSE *et al.*, 2010; BORDIGA *et al.*, 2012; APOLINAR-VALIENTE *et al.*, 2014, 2015b; DOCO *et al.*, 2015; MARTÍNEZ-LAPUENTE *et al.*, 2015, 2018).

TABELA 1: COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DOS OLIGOSSACARÍDEOS ISOLADOS DA AMOSTRA INTEGRAL OBTIDA DA FRAÇÃO ETANÓLICA DA FASE AQUOSA DO VINHO CABERNET FRANC.

Monossacarídeo	% na mistura de oligossacarídeos
Galactose	6,26
Glucose	66,29
Manose	5,40
Ramnose	3,29
Xilose	5,57
Arabinose	5,81
Ácido Galacturônico	4,74
Ácido Glucurônico	2,63

FIGURA 5: PLACA DE TLC DE SILICA GEL 60G COM PADRÕES DE MONOSSACARÍDEOS E AMOSTRA INTEGRAL APÓS METANÓLISE E HIDRÓLISE. FASE MÓVEL UMA MISTURA DE ACETATO DE ETILA:N-PROPANOL:ÁCIDO ACÉTICO:ÁGUA (4:2:2:1). SOLUÇÃO REVELADORA DE ORCINOL:H₂SO₄

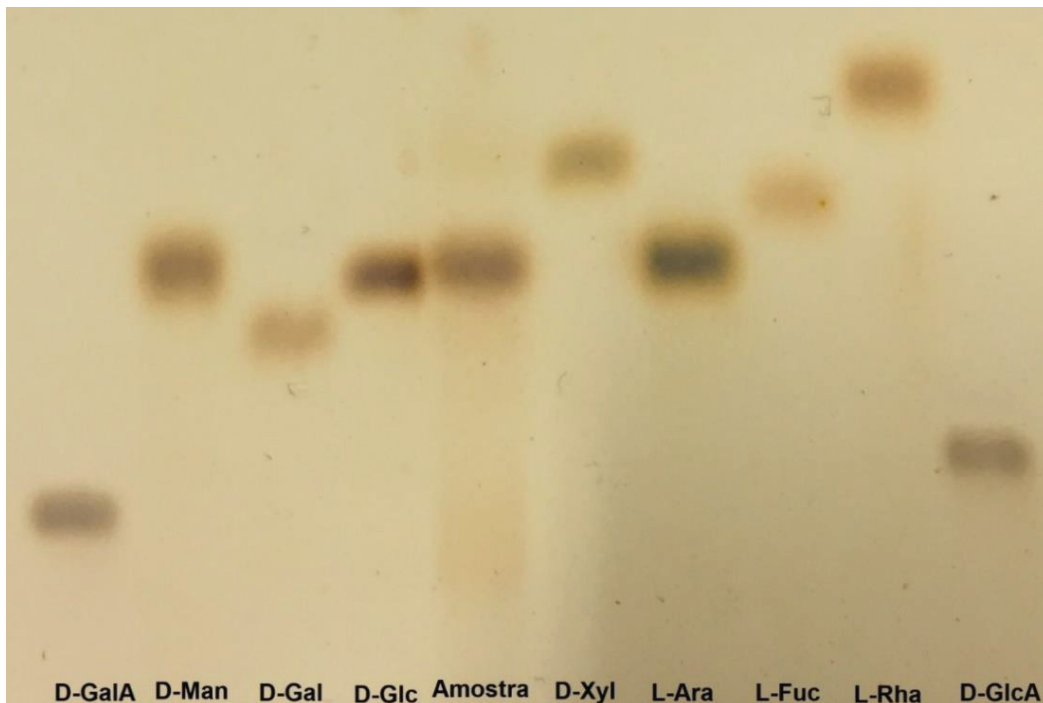


FIGURA 6: ESPECTRO DE RMN 1D ¹H DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA AMOSTRA INTEGRAL APÓS METANÓLISE E HIDRÓLISE COM TFA (0,5 M). JANELA DE δ 4,45 a 5,35. AMOSTRA SOLUBILIZADA EM D₂O A 10 °C, REFERÊNCIA INTERNA TMSP-2,2,3,3-d₄.

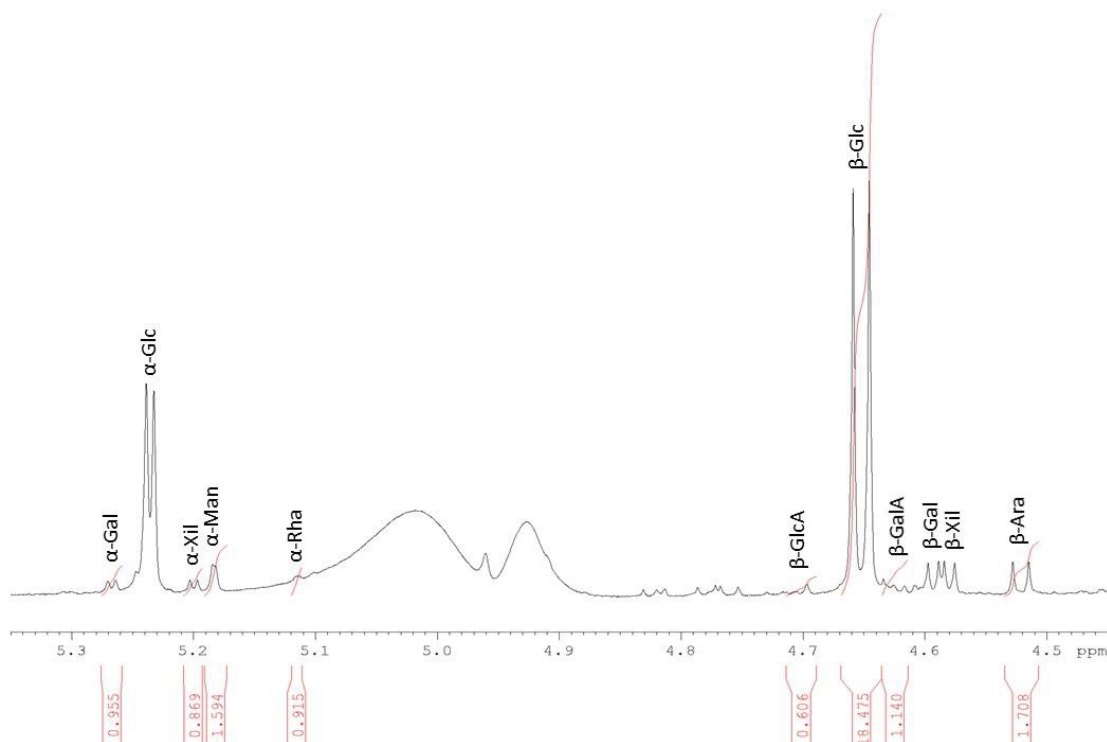
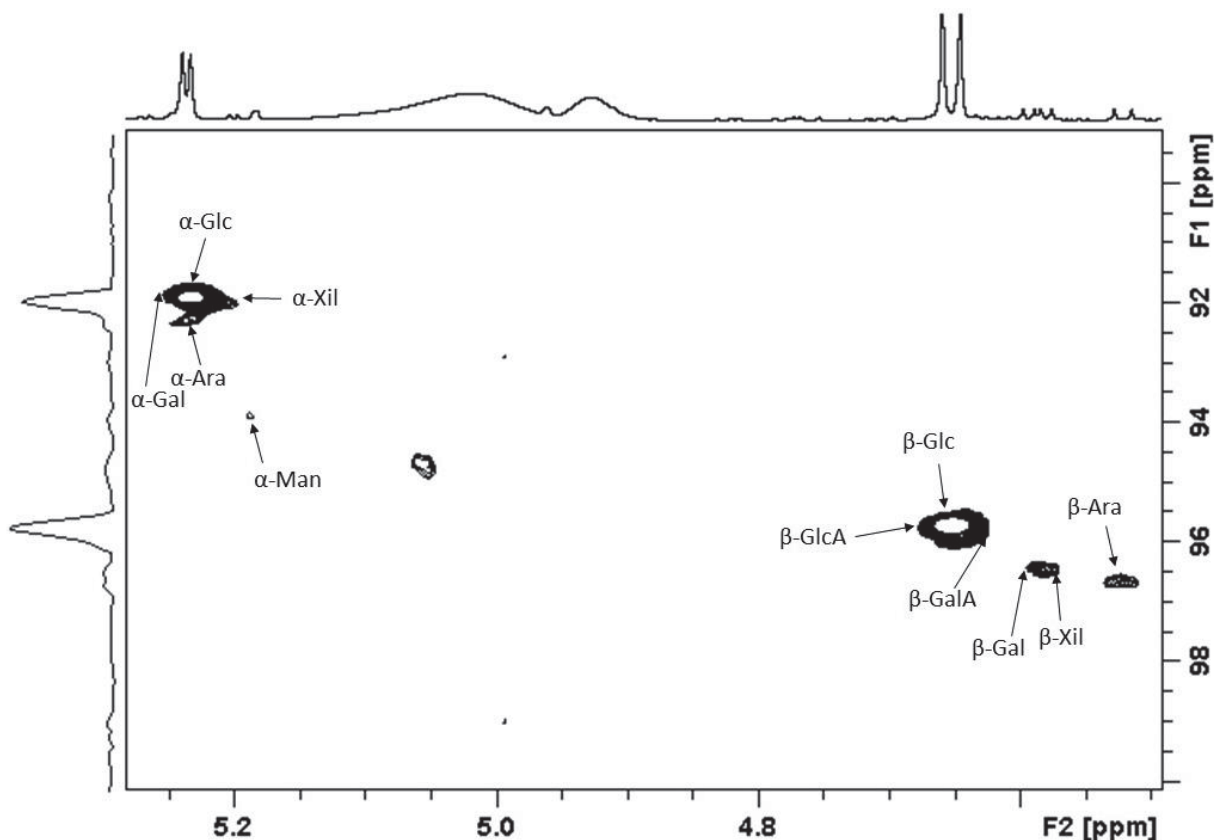


FIGURA 7: MAPA DE CORRELAÇÃO 2D $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA AMOSTRA INTEGRAL APÓS METANÓLISE E HIDRÓLISE COM TFA (0,5 M). JANELA DE δ 89,00/4,48 a 100,0/5,25. AMOSTRA SOLUBILIZADA EM D_2O A 10 °C, REFERÊNCIA INTERNA TMSP-2,2,3,3- d_4 .



5.3 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL

5.3.1 Análises por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os assinalamentos realizados nos espectros 1D de RMN, assim como os mapas de correlação 2D de RMN estão de acordo com a calibração do TMSP-2,2,3,3- d_4 .

Os sinais na região anomérica dos oligossacarídeos da amostra integral (δ 90,0/4,20 – 115,0/5,50) no mapa de correlação heteronuclear 2D $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC são descritos na FIGURA 7. Na região de terminais redutores (δ 93,8/4,56 – 99,6/5,46) foram identificados sinais referentes a D-Glcp (α : δ 94,8/5,23 e δ 94,5/5,44 – β : δ 98,7/4,65 e δ 98,6/4,68), D-Galp (α : δ 95,3/5,25 – β : δ 99,1/4,59), D-Xilp (α : δ 94,9/5,19 – β : δ 99,3/4,57) e D-Manp (α : δ 96,7/5,18 – β : δ 96,5/4,90) (GORIN;

MAZUREK, 1975; DELGOBO *et al.*, 1999, 1998; RODRÍGUEZ-CARVAJAL *et al.*, 2003; SASSAKI *et al.*, 2014).

A sacarose foi identificada através dos deslocamentos químicos detectados em δ C1/H1: 94,9/5,41, C2/H2: 74,2/3,53, C3/H3: 74,9/3,75, C4/H4: 72,4/3,48. Outro dissacarídeo presente na amostra foi a trealose, onde é confirmada pela presença dos sinais em δ C1/H1: 96,00/5,19, C2/H2: 73,8/3,66, C3/H3: 75,2/3,85, C4/H4: 72,4/3,46 and C5/H5: 74,9/3,81. A trealose é um dissacarídeo comum nos vinhos, sendo utilizada como marcador do processo de fermentação alcoólica. Uma vez que é proveniente das leveduras, seus níveis relatam o processo de autólise que esses microrganismos realizam (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006; WISHART *et al.*, 2018).

Os sinais δ C1/H1: 106,7/4,63 e C4/H4: 79,7/4,16 são característicos de β -D-galactanas (1 \rightarrow 4) ligadas, que quando associadas com a presença de \rightarrow 2) α -L-Araf(1 \rightarrow e \rightarrow 3) α -L-Araf(1 \rightarrow através dos sinais em δ C1/H1: 110,6/4,99 e C1/H1: 110,2/5,09, respectivamente, sugerem a presença de oligossacarídeos provenientes da degradação de arabinogalactanas do tipo I (RODRÍGUEZ-CARVAJAL *et al.*, 2003; CIPRIANI *et al.*, 2004, 2009; SHAKHMATOV *et al.*, 2014; SHAKHMATOV; ATUKMAEV; MAKAROVA, 2016; CAILLOT *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2018).

Os sinais em δ C1/H1: 105,5/4,51, C2/H2: 74,2/3,54, C3/H3: 83,5/3,83 com substituição, C4/H4: 71,4/4,15, C5/H5: 78,0/3,69, C6/H6: 63,1/3,70 e C6/H6: 73,3/69,3 com substituição, são característicos de \rightarrow 3,6) β -D-Galp(1 \rightarrow . A presença do sinal em δ C1/H1: 105,6/4,73 remete a β -D-Galp(1 \rightarrow 6). Sinais de β -D-Galp apresentando substituições nas posições 3 e 6, juntamente com a presença de sinais de terminais não redutores de α -L-Araf em δ C1/H1: 111,9/5,25, C2/H2: 83,9/4,20, C5/H5: 76,5/4,14, sugerem a presença de oligossacarídeos com origem nas arabinogalactanas do tipo II. Esse polissacarídeo é presente na composição dos carboidratos da variedade Cabernet Franc realizado por BEZERRA *et al* (2018) (GORIN; MAZUREK, 1975; CARPITA; GIBEAUT, 1993; DELGOBO *et al.*, 1998; RODRÍGUEZ-CARVAJAL *et al.*, 2003; CAPEK *et al.*, 2010; MATULOVÁ *et al.*, 2011; SHAKHMATOV *et al.*, 2014; SHAKHMATOV; ATUKMAEV; MAKAROVA, 2016; STIPP *et al.*, 2017; BEZERRA *et al.*, 2018; CAILLOT *et al.*, 2018).

Os hidrogênios e carbonos anoméricos de α -D-Manp envolvidos em ligação são observados através da presença dos sinais em δ 103,1/5,11, 103,2/5,24, 104,7/5,20 e 104,8/5,03. Respectivamente, são associados a \rightarrow 2,6) α -D-Manp(1 \rightarrow , \rightarrow 2) α -D-Manp(1 \rightarrow e terminais não redutores de α -D-Manp(1 \rightarrow 2) (SHIBATA *et al.*,

1992; KOBAYASHI *et al.*, 1995; VINOGRADOV; PETERSEN; BOCK, 1998; BEZERRA *et al.*, 2018).

Oligossacarídeos provenientes de ramnagalacturananas do tipo I são confirmados pela presença de $\rightarrow 4)\alpha\text{-D-GalpA}(1\rightarrow$ em δ C1/H1: 103,7/4,98 e C4/H4: 83,9/4,35 e a $\rightarrow 2)\alpha\text{-L-Rhap}(1\rightarrow$ com os sinais em δ C1/H1: 100,2/5,31 e o C6/H6: 99,5/1,30 (RENARD *et al.*, 1998; RODRÍGUEZ-CARVAJAL *et al.*, 2003; POPOV *et al.*, 2011; NASCIMENTO *et al.*, 2013; BEZERRA *et al.*, 2018; CAILLOT *et al.*, 2018).

A presença de maltose é sugerida através da associação do sinal em δ C1/H1: 102,4/5,40 que corresponde a $\alpha\text{-D-Glcp}(1\rightarrow 4)$, junto com os sinais dos terminais redutores de D-Glcp,. A presença de C1/H1: 100,7/4,95 ppm referente a $\rightarrow 6)\alpha\text{-D-Glcp}(1\rightarrow 4$, com o restante das unidades de $\alpha\text{-D-Glcp}$ em δ C1/H1: 101,0/4,92 e C1/H1: 101,3/4,93 referentes a presença de ligações $\alpha\text{-D-Glcp}(1\rightarrow 6$, sugerem a presença dos trissacarídeos panose e isomaltotriose (TANIGUCHI; HONNDA, 2009; DOBRUCHOWSKA *et al.*, 2012, 2013).

Oligossacarídeos oriundos de hemicelulose são observados pela presença dos sinais redutores e de ligações envolvendo a D-xilose. Os sinais em δ C1/H1: 103,3/4,53, C2/H2: 77,6/3,43 e C4/H4: 77,9/3,70 ambas com substituição remetem a $\rightarrow 2,4)\beta\text{-D-Xilp}(1\rightarrow$. Os sinais correspondentes a região de grupamentos anoméricos em δ C1/H1: 104,1/4,40 e C4/H4: 78,0/3,70 são referentes a $\rightarrow 4)\beta\text{-D-Xilp}(1\rightarrow$. A presença de 4-O-metil- $\alpha\text{-D-GlcpA}$ é evidenciada pela presença dos sinais de δ C4/H4: 85,2/3,24 e do grupamento metil em 62,7/3,48 ppm (FIGURA 8). O sinal referente a esse açúcar na região anomérica só é visto na fração etanólica de 10% separada (FIGURA 9), sendo o δ C1/H1: 99,9/5,27. Dessa maneira sugerindo ser um 4-O-metil- $\alpha\text{-D-GlcpA}(1\rightarrow 2)$ (BEADLE; MATULOVA; MALOVŔKOVA, 1998; HABIBI; MAHROUZ; VIGNON, 2002, 2003; BENDAHOU *et al.*, 2007).

FIGURA 8: REGIÃO ANOMÉRICA (δ 90,0/4,20 – 115,0/5,50) DO MAPA DE CORRELAÇÃO 2D $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC EDITADO DA AMOSTRA INTEGRAL. AMOSTRA EM D_2O A 30 °C, REFERÊNCIA INTERNA TMSP-2,2,3,3- d_4 E DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EXPRESSOS EM PPM. A: L-Araf; B: D-Galp; C: L-Rhap; D: D-GalpA; E: D-Manp; F: D-Glcp; H: D-Xilp. TR: TERMINAL REDUTOR

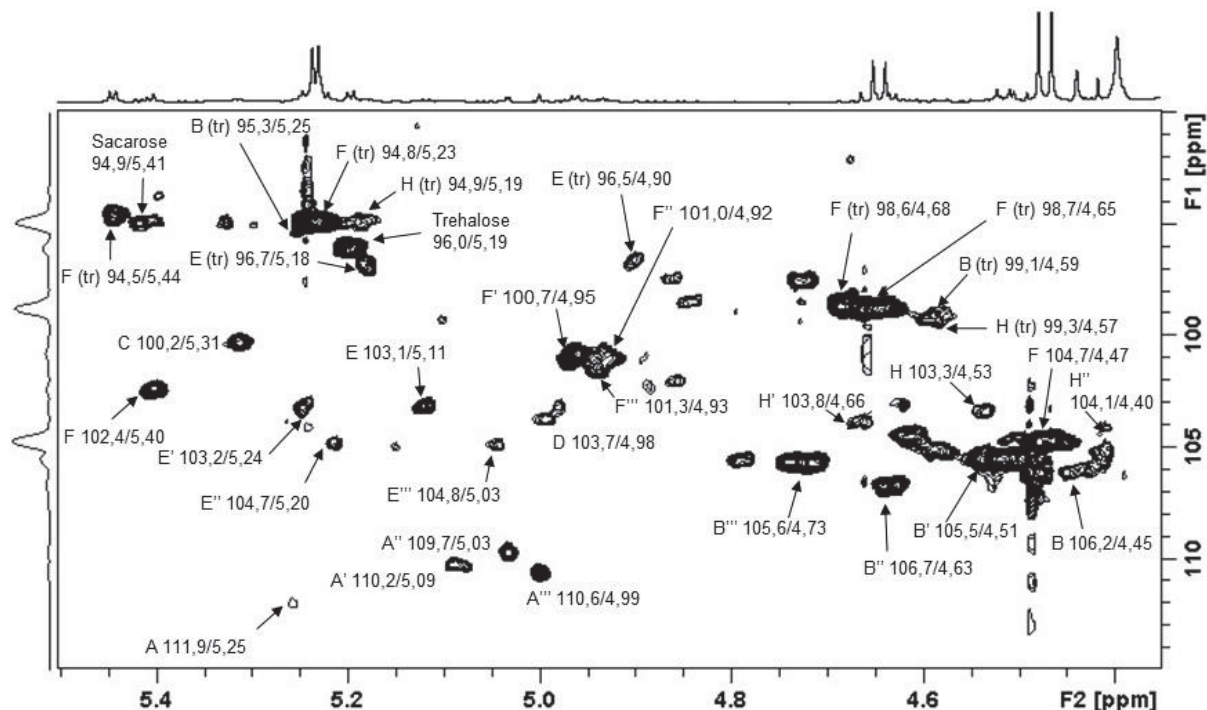


FIGURA 9: MAPA DE CORRELAÇÃO 2D $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC MULTI EDITADO REGIÃO (δ 55,0/2,96 – 90,0/3,66) DA AMOSTRA INTEGRAL. AMOSTRA EM D_2O A 30 °C, REFERÊNCIA INTERNA TMSP-2,2,3,3- d_4 E DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EXPRESSOS EM PPM. M: 4-O-Metil-GlcpA.

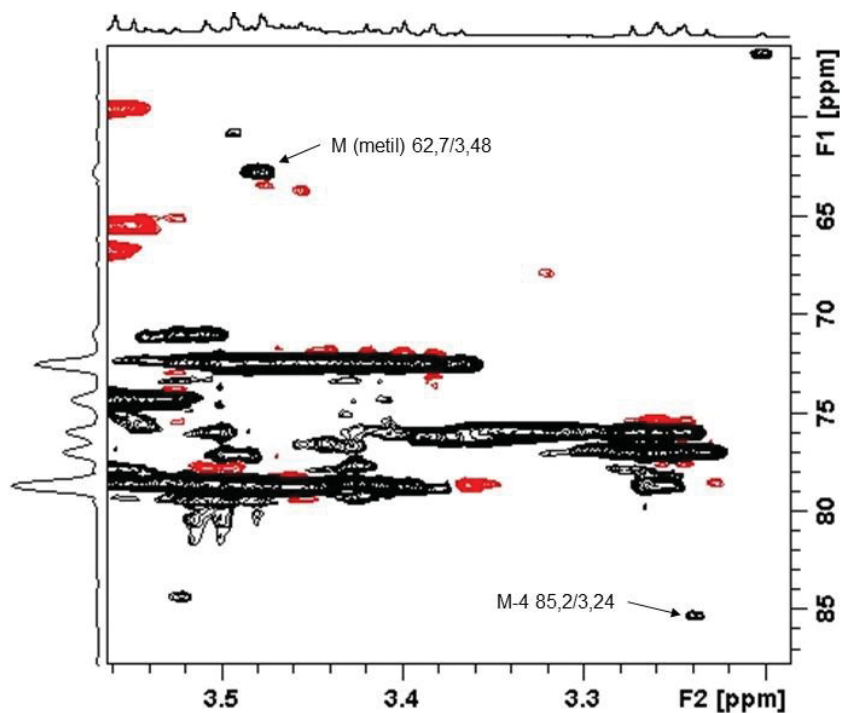
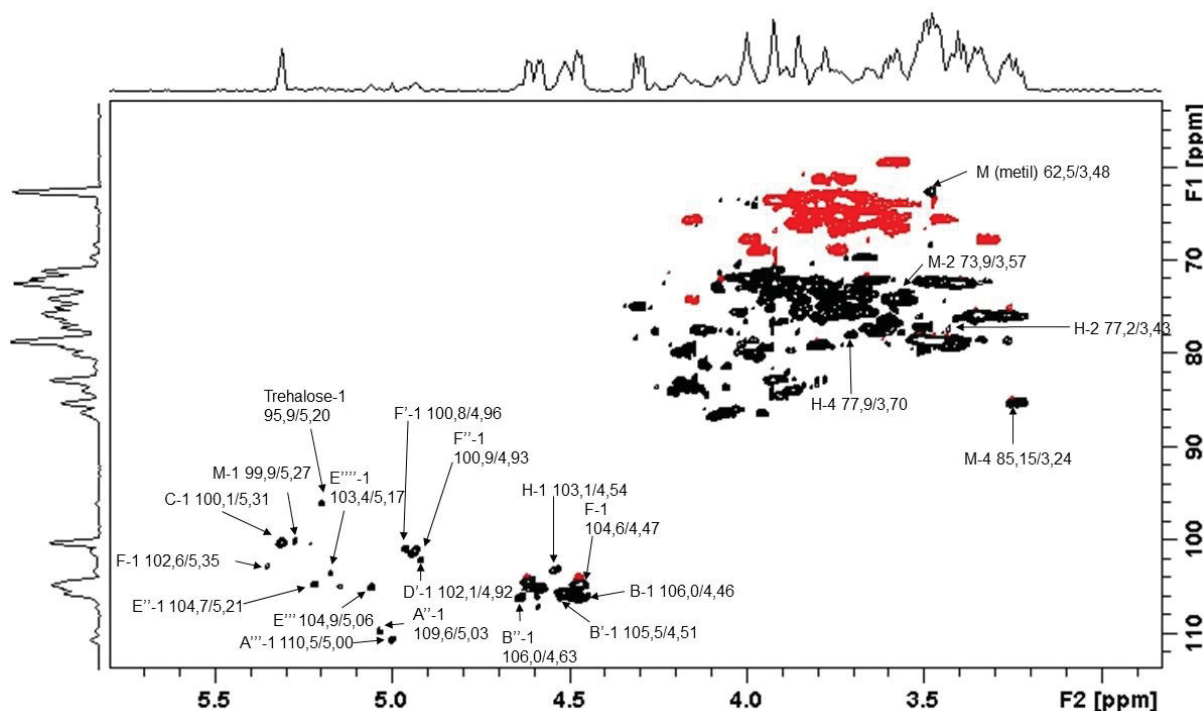
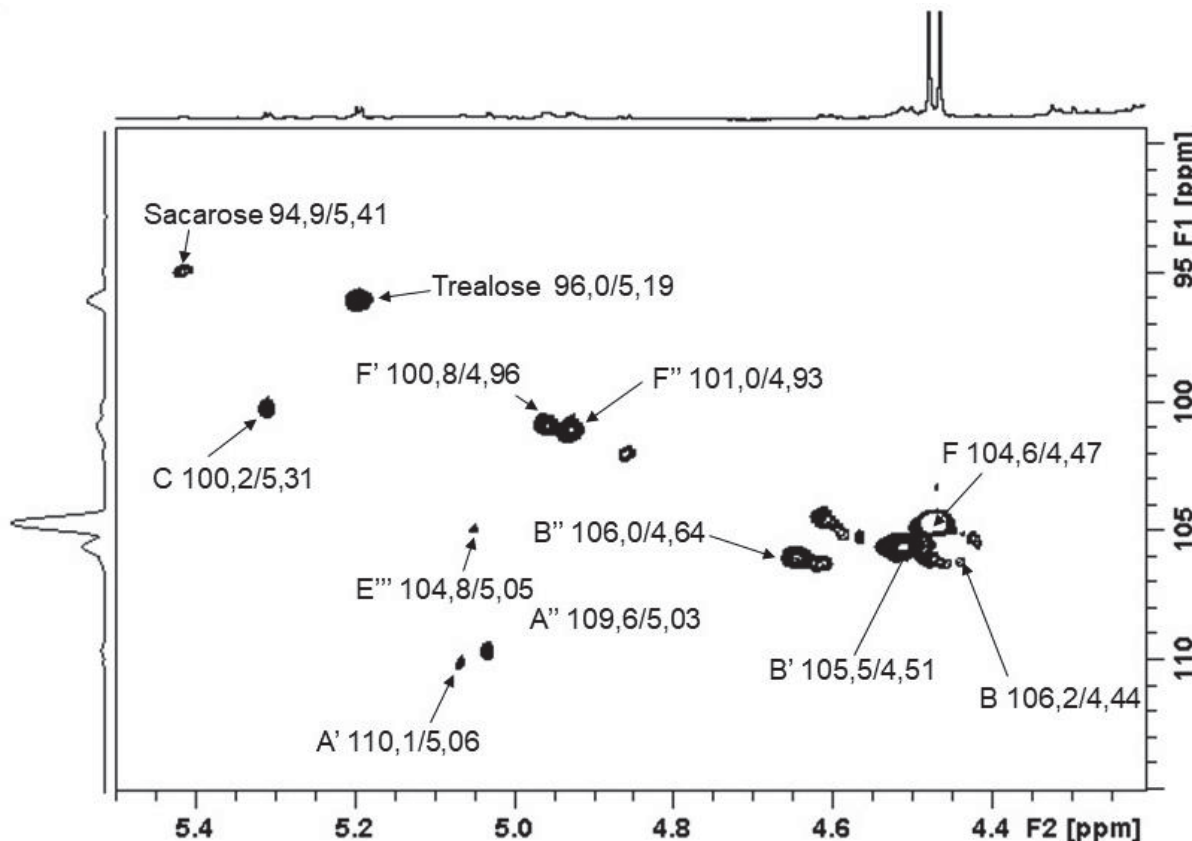


FIGURA 10: MAPA DE CORRELAÇÃO 2D $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC EDITADO (δ 53,0/2,80 – 113,0/5,80). AMOSTRA DA FRAÇÃO ETANÓLICA 10% REDUZIDA COM BH_4Na DILUÍDA EM D_2O A 30 °C, REFERÊNCIA INTERNA TMSP-2,2,3,3- d_4 E DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EXPRESSOS EM PPM. A: L-Araf, B: D-Galp; C: L-Rhap; D: D-GalpA; E: D-Manp; F: D-Glcp; H: D-Xilp, M: 4-O-Metil-GlcpA.



Com o intuito de diminuir a complexidade da amostra para as futuras análises com espectrometria de massas e confirmar a presença de alguns sinais não redutores. A amostra integral teve os seus terminais redutores reduzidos com NaBH_4 . É possível visualizar no mapa de correlação 2D $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ de HSQC editado da amostra integral reduzida (FIGURA 11) a confirmação dos sinais de sacarose (δ 94,9/5,41) e trealose (δ 96,0/5,19). Uma vez que ambos os dissacarídeos não apresentam terminais redutores, consequentemente não foram afetados pela reação de redução (WISHART *et al.*, 2018).

FIGURA 11: REGIÃO ANOMÉRICA (δ 90,0/4,20 – 115,0/5,50) DO MAPA DE CORRELAÇÃO 2D $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC EDITADON DA AMOSTRA INTEGRAL REDUZIDA COM NaBH_4 . AMOSTRA INTEGRAL EM D_2O A 30 °C, REFERÊNCIA INTERNA TMSP-2,2,3,3- d_4 E DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EXPRESSOS EM PPM. A: L-Araf; B: D-Galp; C: L-Rhap; E: D-Manp; F: D-Glcp.



O sinal mais intenso na região anomérica é referente a presença de uma β -D-Glcp com um grupamento etil ligado em O-1. Isso foi evidenciado após o processo de peroxidação e com as análises de nos mapas de correlação heteronuclear 2D $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC e HMBC e com o mapa de correlação homonuclear 2D $^1\text{H}/^1\text{H}$ TOCSY de RMN.

A reação realizada com o metaperiodato de sódio não obteve o resultado esperado na degradação de todas as hidroxilas vicinais. Entretanto, o processo possibilitou a obtenção de uma amostra com uma menor complexidade de deslocamentos químicos, possibilitando a visualização dos picos, antes sobrepostos, relacionados com o grupamento β -D-Glcp. No mapa de correlação heteronuclear 2D $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ de HSQC associado com o mapa de correlação heteronuclear a longa distância 2D $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ de HMBC (FIGURA 10) é visível a presença do sinal referente a δ C1/H1: 104,6/4,47. O hidrogênio em δ 4,47 possui duas correlações de acoplamento via três ligações (3J) sendo a primeira com o carbono do CH_2 ligado em

O-1 (δ 69,0) e a segunda com C3 (δ 78,5). Os hidrogênios do CH₂ se apresentam no HSQC nas posições δ 3,97 e 3,73. Ambos os hidrogênios apresentam uma correlação em 3J com o C1 do carboidrato (δ 104,6) e uma correlação de acoplamento via duas ligações (2J) com o carbono do CH₃ (δ 17,0). Os hidrogênios do CH₃ se apresentam em δ 1,23 e possuem apenas uma correlação, sendo em 2J com o carbono do CH₂ (δ 69,0). Dessa maneira fica evidenciada a presença de um grupamento etil ligado em O-1 (BREITMAIER; VOELTER, 1990; GONÇALVES; ROBERTS; WAN, 2004; PAVIA *et al.* 2016; JACOBSEN, 2017).

A glucose é identificada a partir da correlação de δ H1: 4,47 com C3 (δ 78,5). O δ H3: 3,48 apresenta quatro correlações. Uma primeira correlação 2J com C2 (δ 75,8), uma segunda correlação 2J com C4 (δ 72,4), uma correlação 3J com C1 (δ 104,6) e outra 3J com C5 (δ 73,4). δ H2: 3,25 apresenta três correlações. Uma correlação 2J com C1 (δ 104,6), outra 2J com C3 (δ 78,5) e uma 3J com C4 (δ 72,4). O δ H4: 3,39 também apresenta três correlações, sendo a primeira uma 2J com C3 (δ 78,5), a segunda uma 3J com C2 (δ 75,8) e a terceira uma 3J com C6 (δ 63,4). Os hidrogênios ligados em C6 estão localizados em 3,92 e apresentam uma correlação 2J com C5 (δ 73,4) e uma correlação 3J com C4 (δ 72,4). O δ H5: 3,91 apresenta duas correlações 2J , sendo uma com C4 (δ 72,4) e outra com C6 (δ 63,4) e uma correlação 3J com C3 (δ 78,5). Esses dados de correlação confirmam que a estrutura se trata de uma hexose. O sinal de H1 (δ 4,47) se correlacionado em 90 ms de *mixing time* com os sinais de H2 (δ 3,25), H3 (δ 3,48) e H4 (δ 3,39) no mapa de correlação homonuclear 2D $^1H/^1H$ de TOCSY (FIGURA 11), juntos com os dados de composição monossacarídica (TABELA 1) confirmam que a estrutura se trata de uma glucose (BREITMAIER; VOELTER, 1990; GOFFIN *et al.*, 2009; PAVIA *et al.* 2016; JACOBSEN, 2017).

Essa molécula teve sua presença relatada na urina de indivíduos após o consumo de fermentado de arroz (TEAGUE *et al.*, 2004) e na constituição das bagas provenientes de espinheiros do mar (*Hippophae rhamnoides*) (YANG, 2009).

FIGURA 12: A: MAPA DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA 2D $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HMBC (PRETO) COM MAPA DE CORRELAÇÃO 2D $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC EDITADO (AZUL E ROSA). AMOSTRA INTEGRAL APÓS OXIDAÇÃO COM NaIO_4 EM D_2O A 30 °C, REFERÊNCIA INTERNA TMSP-2,2,3,3- d_4 , DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EXPRESSOS EM PPM. B: ESTRUTURA PROPOSTA COM OS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EM PPM.

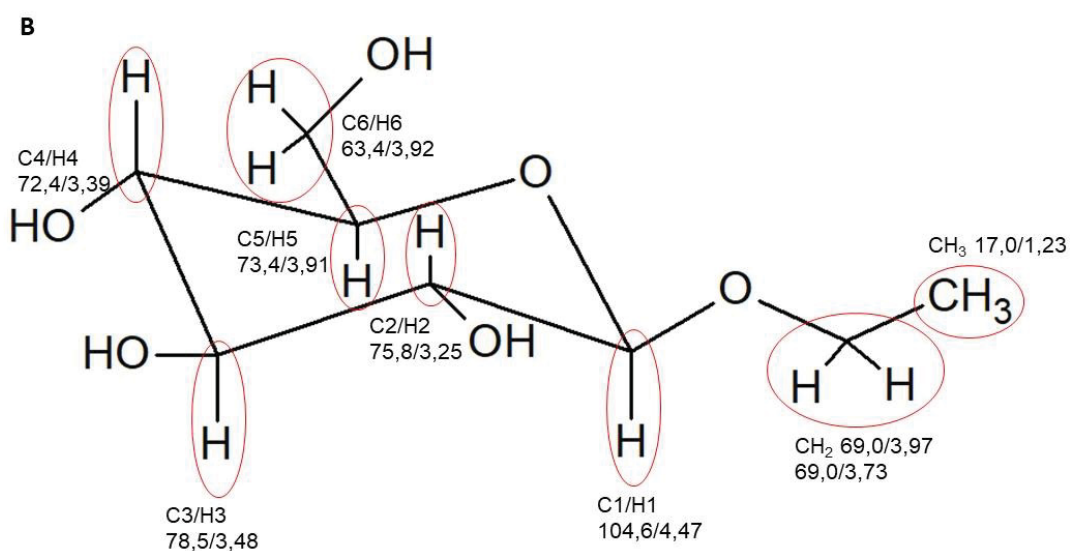
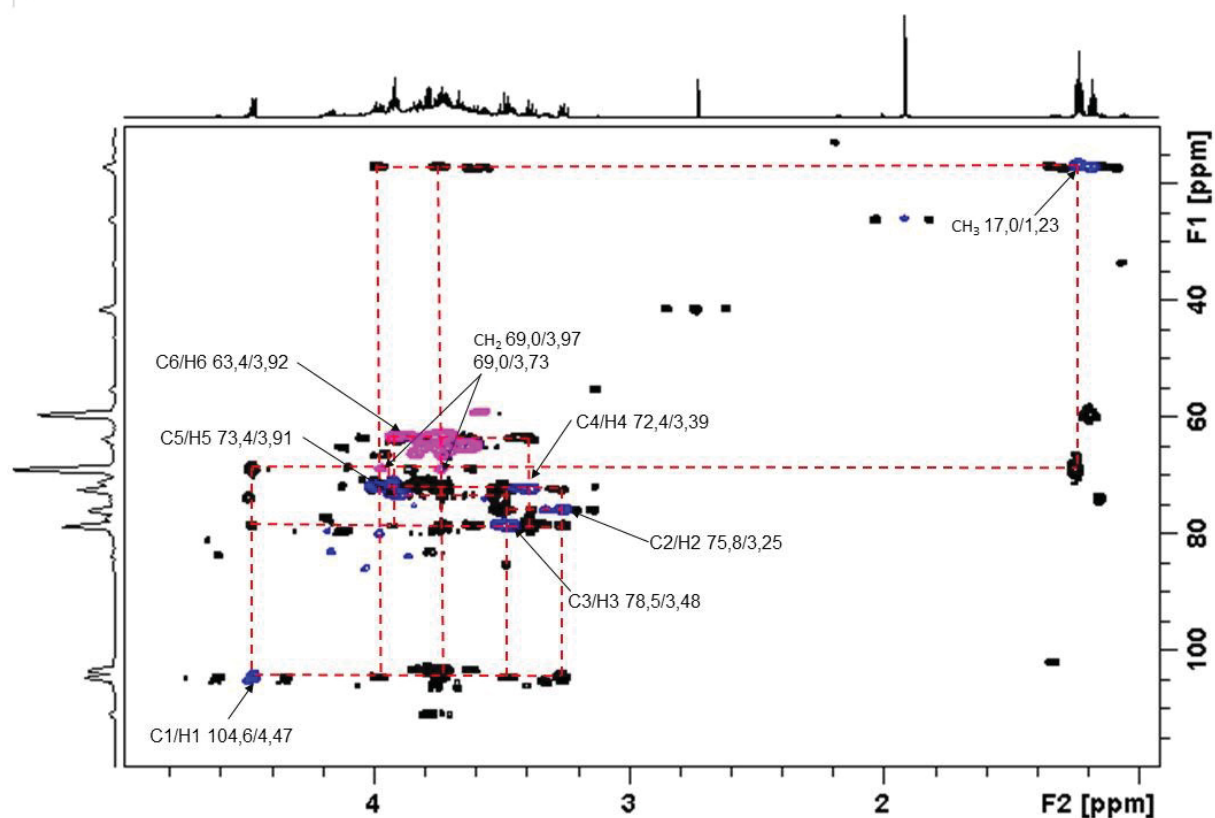
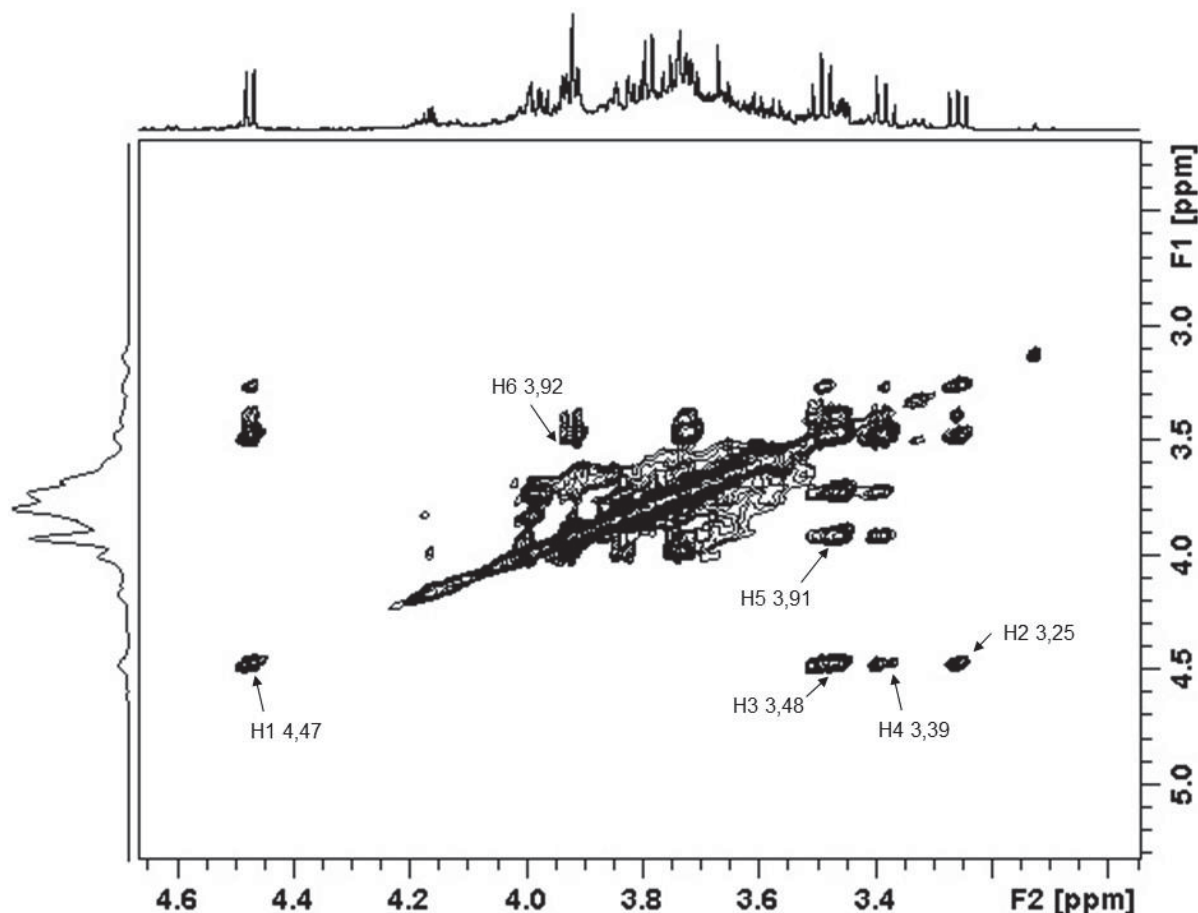


FIGURA 13: MAPA DE CORRELAÇÃO HOMONUCLEAR 2D $^1\text{H}/^1\text{H}$ TOCSY. AMOSTRA INTEGRAL APÓS OXIDAÇÃO COM NaIO_4 EM D_2O A 30°C , REFERÊNCIA INTERNA TMSP-2,2,3,3- d_4 E DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EXPRESSOS EM PPM.



5.3.2 Análises com Espectrometria de Massas

Na tabela 2 estão listados os principais valores de m/z e as propostas de estruturas correspondentes. Os valores de m/z encontrados são referentes as massas dos íons adutados com lítio. Foi observado, de acordo com as massas e os perfis de fragmentação, que os oligossacarídeos encontrados no vinho Carbrnet Franc consistem de dissacarídeos e trissacarídeos (SASSAKI; SOUZA, 2013).

O principal íon molecular positivo formado possui uma relação m/z de 215,11 (FIGURA 12). Essa relação corrobora com os dados encontrados nas análises de RMN, confirmando a presença da molécula 1-O-etil- β -Glc p (GONÇALVES; ROBERTS; WAN, 2004; TEAGUE *et al.*, 2004). Como oligossacarídeos majoritários temos a relação m/z de 351,14. Esse íon apresentou um perfil de fragmentação B_1/Y_1 originando um fragmento de m/z de 189,09 que é compatível com a massa de

uma hexose reduzida adutada com Li^+ e uma perda neutra de 162,05 m/z (FIGURA 13). A presença de maltose é corroborada com essa m/z e os sinais encontrados no mapa de correlação 2D $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ de HSQC em δ C1/H1: 94,8/5,23 e δ C1/H1: 106,2/4,45, respectivamente. Outros dissacarídeos constituídos por α -D-Manp e β -D-Galp também podem estar corroborando com a presença majoritária dessa relação m/z no espectro. A massa de 349,13 m/z associada com os dados de RMN onde δ C1/H1: 94,9/5,41 e C1/H1: 96,0/5,19 ppm corroboram com a presença de sacarose e trehalose, respectivamente (DOMON; COSTELLO, 1988; DOBRUCHOWSKA *et al.*, 2012, 2013; SASSAKI; SOUZA, 2013; WISHART *et al.*, 2018). A presença de dissacarídeos formados por D-Glcp é relatada em vinhos das variedades Koshu, Chardonnay, Riesling e Pinot Gris (NAKANISHI; YOKOTSUKA, 1989).

A massa de 483,18 m/z associada aos sinais de β -D-Xilp sugere a presença de um trissacarídeo constituído por β -D-Xilp (1 \rightarrow 4). Pelo perfil de fragmentação no Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM) (FIGURA 14) onde um fragmento adutado com Li^+ de massa 215,11 m/z é gerado a partir de uma fragmentação $^{2,5}\text{A}_1$ e com uma perda neutra de 208,8 m/z . Oligossacarídeos oriundos de xilanas de hemiceluloses são descritos em vinhos Cabernet Sauvignon, Syrah, Monastrell, Carignan e Merlot (DOMON; COSTELLO, 1988; DUCASSE *et al.*, 2010; APOLINAR-VALIENTE *et al.*, 2015b).

Após fragmentar o íon 483,18 m/z foram obtidos dois fragmentos. Um primeiro fragmento de 351,14 m/z resultante de uma fragmentação B_1/Y_2 com uma perda neutra de 132,04 m/z , sugerindo a presença de uma pentose ligada a duas hexoses e um segundo fragmento com 275,10 m/z resultante de uma fragmentação $^{1,5}\text{X}_1$. A presença de uma pentose ligada a hexoses é corroborada com a presença de oligossacarídeos oriundos de arabinogalactanas. A metodologia de ESI-MS, quando aplicada de forma isolada e sem nenhuma etapa de derivatização e cromatografia prévia, não é capaz de identificar quais ligações estão envolvidas na estrutura desse trissacarídeo (DOMON; COSTELLO, 1988; DELGOBO *et al.*, 1998, 1999; SASSAKI; SOUZA, 2013).

A presença de trissacarídeos constituídos por hexoses é corroborada com a presença da massa de 513,19 m/z . A panose e a isomaltotriose apresentam sinais no mapa de correlação 2D $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC (FIGURA 7). A presença de trissacarídeos constituídos por α -D-Manp e β -D-Galp também estão corroborando com a presença

dessa massa (DOMON; COSTELLO, 1988; DOBRUCHOWSKA *et al.*, 2012, 2013; SASSAKI; SOUZA, 2013; WISHART *et al.*, 2018).

TABELA 2: DADOS DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS (EM) E RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) DOS OLIGOSSACARÍDEOS PRESENTES NO VINHO CABERNET FRANC.

<i>m/z</i>	Estruturas propostas
215,11	*[1-O-etil-β-Glcp•Li] ⁺ - terminal não redutor N1: (δ 104,6/4,47)
321,13	*[α-L-Araf→β-D-Galp•Li] ⁺ - α-L-Araf terminal não redutor N1: (δ 111,9/5,25), α-D-Galp terminal redutor N1: (δ 95,3/5,25) e β-D-Galp terminal redutor N1: (δ 99,1/4,59)
349,13	*[Sac•Li] ⁺ ou *[Tre•Li] ⁺ - Sacarose α-D-Glcp N1: (δ 94,9/5,41); Trealose α-D-Glcp N1: (δ 96,0/5,19).
351,14	*[Mal•Li] ⁺ ou [α-D-Manp ₂ •Li] ⁺ ou [β-D-Galp ₂ •Li] ⁺ - Maltose α-D-Glcp(1→4) N1: (δ 102,4/5,40), α-D-Glcp terminal redutor N1: (δ 94,8/5,23) e β-D-Glcp terminal redutor N1: (δ 98,7/4,65).
377,16	[D-Glcp→(1-etil-β-Glc)•Li] ⁺
423,19	*[β-D-Xilp ₃ •Li] ⁺ - β-D-Xilp(1→4) N1: (δ 104,1/4,40); α-D-Xilp terminal redutor N1: (δ 94,9/5,19) e β-D-Xilp terminal redutor (δ 99,3/4,57)
483,18	*[α-L-Araf→β-D-Galp ₂ •Li] ⁺
513,19	*[α-D-Glcp ₃ •Li] ⁺ ou [α-D-Manp ₃ •Li] ⁺ ou [β-D-Galp ₃ •Li] ⁺ - Panose α-D-Glcp(1→6) N1: (δ 101,0/4,92), →6)α-D-Glcp(1→4 N1: (δ 100,7/4,95), α-D-Glcp terminal redutor N1: (δ 94,8/5,23) e β-D-Glcp terminal redutor N1: (δ 98,7/4,65); Isomaltotriose α-D-Glcp(1→6) N1: (δ 101,0/4,92), →6)α-D-Glcp(1→ N1: (δ 101,3/4,93), α-D-Glcp terminal redutor N1: (δ 94,8/5,23) e β-D-Glcp terminal redutor N1: (δ 98,7/4,65)

* Deduzido pelo mapa de correlação 2D ¹H/¹³C HSQC com os dados obtidos no EM, após os oligossacarídeos serem reduzidos com NaBH₄ e adutados com Li⁺.

FIGURA 14: ESPECTRO DE MASSAS FULL SCAN EM MODO POSITIVO DE IONIZAÇÃO. OS ÍONS (*m/z*) DOS OLIGOSSACARÍDEOS FORAM OBTIDOS NA SUA FORMA REDUZIDA E ADUTADOS COM Li⁺.

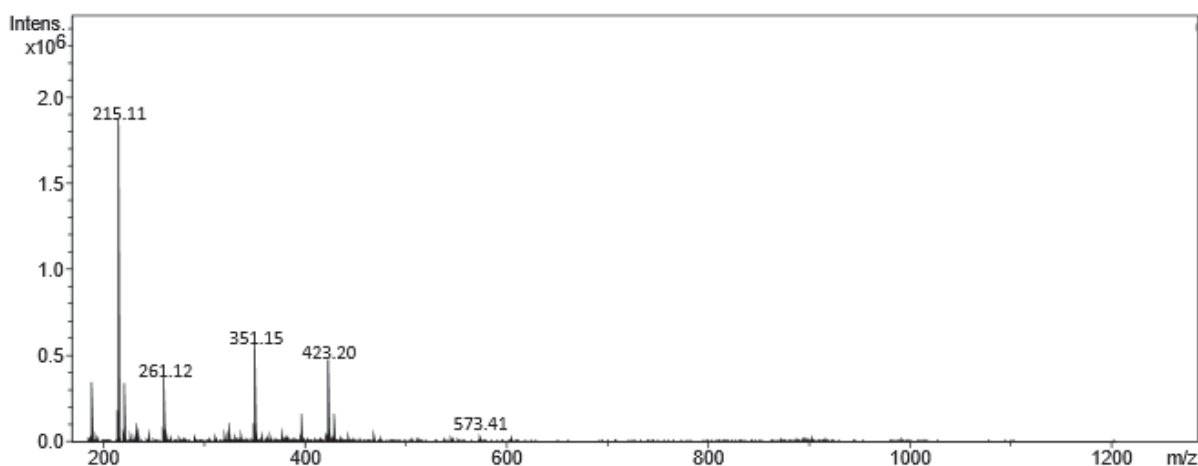


FIGURA 15: ESPECTRO DE MASSAS MRM EM MODO POSITIVO DE IONIZAÇÃO. OS FRAGMENTOS DE MASSA (m/z) DOS OLIGOSSACARÍDEOS FORAM OBTIDOS NA SUA FORMA REDUZIDA E ADUTADOS COM Li^+ . OS ÍONS FORMADOS NO ESPECTRO DE BAIXA ENERGIA CID MS/MS DE 351,14 m/z . FRAGMENTOS FORMADOS SÃO CONSISTENTES COM $[\text{Hex}_2 \cdot \text{Li}]^+$. A m/z 189,09 $[\text{M}-\text{B}_1 \cdot \text{Li}]^+$ E A m/z DE PERDA NEUTRA 162,05.

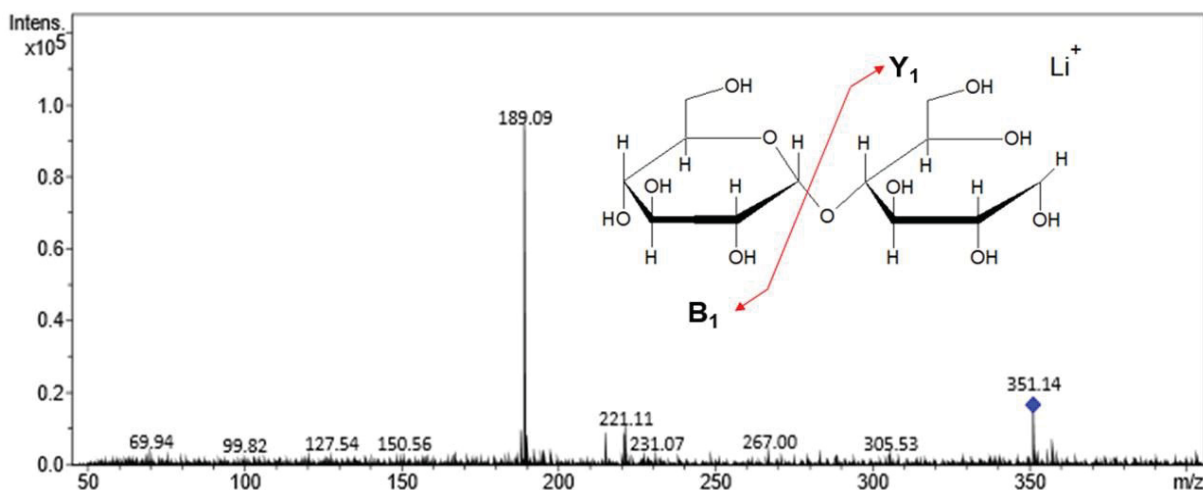


FIGURA 16: ESPECTRO DE MASSAS MRM EM MODO POSITIVO DE IONIZAÇÃO. OS FRAGMENTOS DE MASSA (m/z) DOS OLIGOSSACARÍDEOS FORAM OBTIDOS NA SUA FORMA REDUZIDA E ADUTADOS COM Li^+ . OS ÍONS FORMADOS NO ESPECTRO DE BAIXA ENERGIA CID MS/MS DE 423,19 m/z . FRAGMENTOS FORMADOS NO MRM SÃO CONSISTENTES COM $[\text{Xil}_3 \cdot \text{Li}]^+$. A m/z 215,11 $[\text{M}-^{2,5}\text{A}_1 \cdot \text{Li}]^+$ E A m/z DE PERDA NEUTRA 208,08.

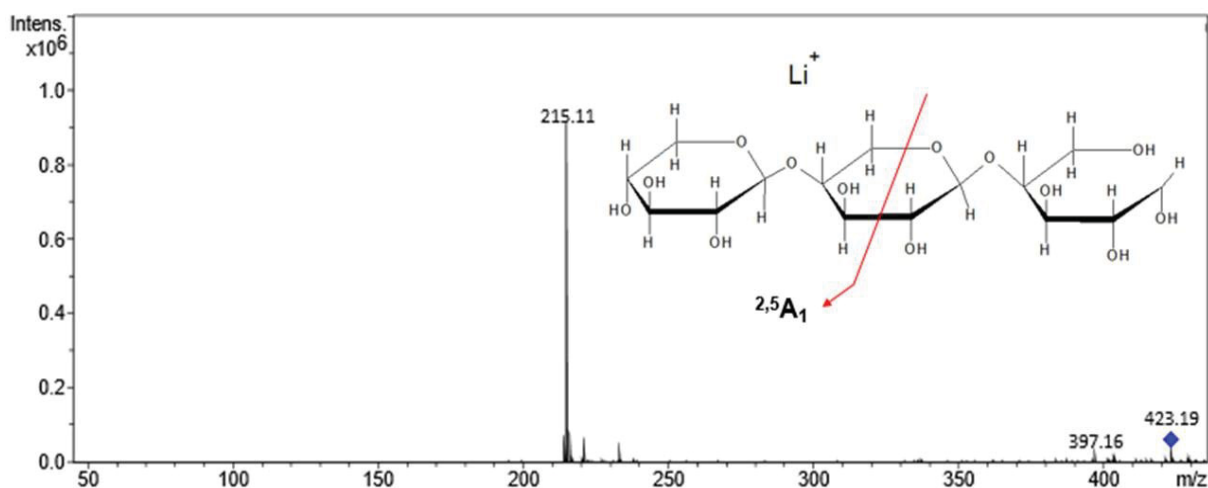
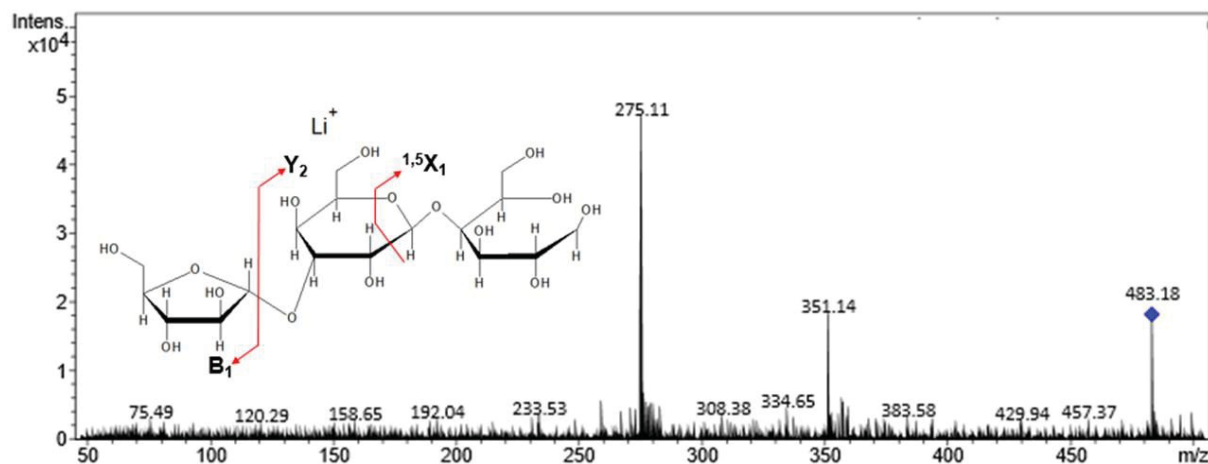


FIGURA 17: ESPECTRO DE MASSAS MRM EM MODO POSITIVO DE IONIZAÇÃO. OS FRAGMENTOS DE MASSA (m/z) DOS OLIGOSSACARÍDEOS FORAM OBTIDOS NA SUA FORMA REDUZIDA E ADUTADOS COM Li^+ . OS ÍONS FORMADOS NO ESPECTRO DE BAIXA ENERGIA CID MS/MS DE 483,18 m/z . FRAGMENTOS FORMADOS NO MRM SÃO CONSISTENTES COM $[\text{L-Araf} \rightarrow \text{D-Galp2} \cdot \text{Li}]^+$. A m/z 351,14 $[\text{M}-\text{Y}_2 \cdot \text{Li}]^+$ COM UMA PERDA NEUTRA DE 132,04 m/z . OUTRO FRAGMENTO DE 275,10 m/z $[\text{M}-^{1,5}\text{X}_1 \cdot \text{Li}]^+$ COM PERDA NEUTRA DE 208,08 m/z .



6. CONCLUSÕES

Os oligossacarídeos identificados no vinho da variedade Cabernet Franc apresentaram uma constituição diversificada, sugerindo que sua origem é decorrente da degradação de diferentes polissacarídeos oriundos das bagas de uvas e dos microrganismos envolvidos no processo da fermentação alcoólica.

Os processos de purificação adotados obtiveram um bom desempenho em remover os compostos fenólicos e moléculas secundárias provenientes do metabolismo da fermentação alcoólica do vinho.

Foi observado que a D-Glcp é o monossacarídeo majoritário na constituição dos oligossacarídeos da amostra, sendo visualizada sua presença nos oligossacarídeos de sacarose, maltose, trealose, panose e isomaltotriose.

Este trabalho é o primeiro que relata a composição monossacarídica dos oligossacarídeos presentes no vinho pela técnica de Ressonância Magnética Nuclear.

Oligossacarídeos provenientes de arabinogalactanas são confirmados pela associação dos sinais de D-Galp e L-Araf no mapa de correlação 2D $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC com a presença dos íons moleculares (m/z) 321,13 e 483,18 no espectro de massas.

Os sinais de D-Xilp e 4-O-Metil-D-GlcpA sugerem a presença de oligossacarídeos provenientes de hemiceluloses. As análises em espectrometria de massas mostram um trissacarídeo de D-Xilp (1→4) que corrobora com a presença dos desses oligossacarídeos.

Foi observado um etil-glucosídeo como o principal constituinte da amostra. Essa molécula não é comumente relatada na literatura. Análises de ^1H , HSQC, HMBC e TOCSY realizadas por Ressonância Magnética Nuclear, assim como análises em Espectrometria de Massas de alta resolução demonstram que a molécula se trata de uma β -D-Glcp com um grupamento etil ligado em O-1.

Como perspectivas futuras:

- Buscar a origem do etil-glucosídeo que se apresenta de forma majoritária na amostra.
- Realizar uma purificação mais refinada da amostra através da cromatografia líquida de alta performance (HPLC), de tal forma que seja possível visualizar estruturas minoritárias.

- Realizar análises por metilação para a identificação das ligações glicosídicas envolvidas nas estruturas.
- Aplicar a metodologia em outras variedades de vinhos, com o intuito de averiguar se existe um padrão *fingerprint* dos oligossacarídeos de acordo com a variedade.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APOLINAR-VALIENTE, R. *et al.* Effect of enzyme additions on the oligosaccharide composition of Monastrell red wines from four different wine-growing origins in Spain. **Food Chemistry**, v. 156, p. 151–159, 2014.

APOLINAR-VALIENTE, R. *et al.* Cell wall compounds of red grapes skins and their grape marcs from three different winemaking techniques. **Food Chemistry**, v. 187, p. 89–97, 2015a.

APOLINAR-VALIENTE, R. *et al.* Oligosaccharides of Cabernet Sauvignon, Syrah and Monastrell red wines. **Food Chemistry**, v. 179, p. 311–317, 2015b.

AVIRAM, M.; FUHRMAN, B. Wine flavonoids protect against LDL oxidation and atherosclerosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 957, p. 146–161, 2002.

ASPINALL, G.O. Chemistry of cell wall polysaccharides. In: STUMPF, P. K.; CONN, E. E. **The biochemistry of plants**. New York: Academic Press. v. 3, p. 473-500, 1980.

BARATA, A.; MALFEITO-FERREIRA, M.; LOUREIRO, V. The microbial ecology of wine grape berries. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, n. 3, p. 243–259, 2012.

BEADLE, B.; MATULOVA, Â.; MALOVŔKOVA, A. (4-O-Methyl-d-glucurono)-d-xylan from *Rudbeckia fulgida*, var. *sullivantii*. **Carbohydrate Research**, v. 308, p. 99–105, 1998.

BEN, R. L.; MONTEIRO, R. **Vinificação de uvas tintas | Vinificação de uvas brancas**. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/162216/1/ELAB-VINHO-2017.pdf>>. Acesso em: 07/02/2019

BENDAHOU, A. *et al.* Isolation and structural characterization of hemicelluloses from palm of *Phoenix dactylifera* L. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, p. 601–608, 2007.

BEZERRA, I. DE L. *et al.* Structural characterization of polysaccharides from Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon and Sauvignon Blanc wines: Anti-inflammatory activity in LPS stimulated RAW 264.7 cells. **Carbohydrate Polymers**, v. 186, n. January, p. 91–99, 2018.

BLÜEMELHUBER, G. In: OLIVER, G. **The Oxford Companion to Beer**. Oxford University Press, New York, 1 ed, p. 426, 2012.

BONDADA, B. R.; KELLER, M. Not All Shrivels Are Created Equal — Morpho-Anatomical and Compositional Characteristics Differ among Different Shivel Types That Develop during Ripening of Grape (*Vitis vinifera* L.) Berries. **American Journal of Plant Sciences**, v. 3, n. July, p. 879–898, 2012.

BORDIGA, M. *et al.* Identification and characterization of complex bioactive oligosaccharides in white and red wine by a combination of mass spectrometry and gas chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 14, p. 3700–3707, 2012.

BORGHEZAN, M. Formação e maturação da uva e os efeitos sobre os vinhos: Revisão. **Ciência e Técnica Vitivinícola**, v. 32, n. 2, p. 126–141, 2017.

BREITMAIER, E.; VOELTER, W. **Carbon-13 NMR Spectroscopy: High Resolution Methods and Applications in Organic Chemistry and Biochemistry**. 3 ed ed. New York: VCH, 1990.

BRUCKNER, J. Estimation of Monosaccharides by the Orcinol-Sulphuric Acid Reaction. **Biochemical Journal**, v. 60, n. 2, p. 200–205, 1955.

CALA, O. *et al.* NMR and molecular modeling of wine tannins binding to saliva proteins: revisiting astringency from molecular and colloidal prospects. **The FASEB Journal**, v. 24, n. 11, p. 4281–4290, 2010.

CAILLOT, A. R. C. *et al.* Structural characterization of blackberry wine polysaccharides and immunomodulatory effects on LPS-activated RAW 264 . 7 macrophages. **Food Chemistry**, v. 257, p. 143–149, 2018.

CAPEK, P. *et al.* Structural features of an arabinogalactan-protein isolated from instant coffee powder of *Coffea arabica* beans. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 1, p. 180–185, 2010.

CARPITA, N. C.; GIBEAUT, D. M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during. **The Plant Journal**, v. The Plant, n. 3, p. 1–30, 1993.

CESCUTTI, P.; RIZZO, R. Divalent cation interactions with oligogalacturonides. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, p. 3262–3267, 2001.

CHAARI, F. *et al.* Antibacterial and antioxidant properties of mixed linkage beta-oligosaccharides from extracted β -glucan hydrolysed by *Penicillium occitanis* EG L lichenase. **Natural Product Research**, v. 6419, n. August, p. 1–7, 2015.

CHEYNIER, V. *et al.* Chemistry of Wine. In: HUNG-WEN, L.; MANDER, L. (Eds.). **Comprehensive Natural Products II - Chemistry and Biology**. [s.l.] Elsevier Ltd., v. 3, p. 1119–1172, 2010.

CHO, M. J. *et al.* Flavonoid glycosides and antioxidant capacity of various blackberry, blueberry and red grape genotypes determined by highperformance liquid chromatography / mass spectrometry. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, p. 1771–1782, 2004.

CIPRIANI, T. R. *et al.* An Arabinogalactan Isolated from the Medicinal Plant *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 4, p. 703–706, 2004.

CIPRIANI, T. R. *et al.* Gastroprotective effect of a type I arabinogalactan from soybean meal. **Food Chemistry**, v. 115, n. 2, p. 687–690, 2009.

CONDE, C. *et al.* Biochemical Changes throughout Grape Berry Development and Fruit and Wine Quality. **Food ©2007 Global Science Books**, v. 1, n. 1, p. 1–22, 2007.

COOMBE, B. G. Research on Development and Ripening of the Grape Berry. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 43, n. 1, p. 101–110, 1992.

CROS, S. *et al.* Solution Conformations of Pectin Polysaccharides: Determination of Chain Characteristics by Small Angle Neutron Scattering , Viscometry , and Molecular Modeling. **Biopolymers**, v. 39, p. 339–352, 1996.

CUEVA, C. *et al.* An integrated view of the effects of wine polyphenols and their relevant metabolites on gut and host health. **Molecules**, v. 22, n. 1, p. 1–15, 2017.

DARVILL, A. G.; ALBERSHEIM, P. Phytoalexins and their Elicitors-A Defense Against Microbial Infection in Plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 35, n. 1, p. 243–275, 1984.

DARVILL, A. G. *et al.* STRUCTURE AND FUNCTION OF PLANT CELL WALL. **Journal of Cell Science**, v. 1985, n. 2, p. 203–217, 1985.

DELGOBO, C. L. . *et al.* Gum heteropolysaccharide and free reducing mono and oligosaccharides of *Anadenanthera colubrina*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 97, p. 1207–1214, 1998.

DELGOBO, C. L. *et al.* The free reducing oligosaccharides of angico branco (*Anadenanthera colubrina*) gum exudate: An aid for structural assignments in the heteropolysaccharide. **Carbohydrate Research**, v. 320, n. 3–4, p. 167–175, 1999.

DOBRUCHOWSKA, J. M. *et al.* Structural characterization of linear isomalto-/malto-oligomer products synthesized by the novel GTFB 4,6 α -glucanotransferase enzyme from *Lactobacillus reuteri* 121. **Glycobiology**, v. 22, n. 4, p. 517–528, 2012.

DOBRUCHOWSKA, J. M. *et al.* Gluco-oligomers initially formed by the reuteransucrase enzyme of *Lactobacillus reuteri* 121 incubated with sucrose and malto-oligosaccharides. **Glycobiology**, v. 23, n. 9, p. 1084–1096, 2013.

DOCO, T. *et al.* Rhamnogalacturonan II, a dominant polyssacharide in juices produces by enzymic liquefaction of fruits and vegetables. **Carbohydrate Research**, v. 297, p. 181–186, 1997.

DOMON, B.; COSTELLO, C. E. A Systematic Nomenclature for Carbohydrate Fragmentations in FAB-MS / MS Spectra of Glycoconjugates. **Glycoconjugate**, v. 5, p. 397–409, 1988.

DUBOIS, M. *et al.* Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

DUCASSE, M. A. *et al.* Isolation of Carignan and Merlot red wine oligosaccharides and their characterization by ESI-MS. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 3, p. 747–754, 2010.

DUPIN, I. V. S. *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* Mannoproteins That Protect Wine from Protein Haze: Their Release during Fermentation and Lees Contact and a Proposal for Their Mechanism of Action. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3098–3105, 2000.

FERNANDES, I. *et al.* Wine flavonoids in health and disease prevention. **Molecules**, v. 22, n. 2, 2017.

FLEET, G. H. Yeast interactions and wine flavour. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, p. 11–22, 2003.

FUHRMAN, B.; AVIRAM, M. Preservation of paraoxonase activity by wine flavonoids: possible role in protection of LDL from lipid peroxidation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 957, p. 321–324, 2002.

FULGÊNCIO, A. C. **Série uvas - Cabernet Franc**. Disponível em: <<https://winepedia.com.br/sommelier-wine/serie-uvas-cabernet-franc/>>. Acesso em: 14/02/2019.

GABRIELIAN, A.; KAZUMYAN, K. The investigation of phenolic compounds and anthocyanins of wines made of the grape variety karmrahyut. **Annals of Agrarian Science**, v. 16, n. 2, p. 160–162, 2018.

GILBERT, J. A.; LELIE, D. VAN DER; ZARRAONAINDIA, I. Microbial terroir for wine grapes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 1, p. 5–6, 2014.

GOFFIN, D. *et al.* A Systematic NMR Determination of α -D-Glucooligosaccharides, Effect of Linkage Type, Anomeric Configuration and Combination of Different Linkages Type on C Chemical Shifts for the Determination of Unknown Isomaltooligosaccharides. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 30, n. 11, p. 2535–2541, 2009.

GONÇALVES, F. *et al.* Characterization of white wine mannoproteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 21, p. 6097–6101, 2002.

GONÇALVES, P. M. L.; ROBERTS, M.; WAN, P. W. H. Regioselective acylation of carbohydrate derivatives using lipases leading to a facile two-step procedure for the separation of some α - and β -glucopyranosides and galactopyranosides. **Tetrahedron**, v. 60, p. 927–932, 2004.

GORIN, P. A. J.; MAZUREK, M. Further Studies on the Assignment of Signals in ^{13}C Magnetic Resonance Spectra of Aldoses and Derived Methyl Glycosides. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 53, n. 8, p. 1212–1223, 1975.

GUERRA, C. C. . *et al.* **Conhecendo o essencial sobre uvas e vinhos**. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/26041/1/Doc48.pdf>>. Acesso em: 12/02/2019

GUERRA, C.C; SILVA, G.A. **Uva para processamento - Processo de elaboração.** Disponível em: <
http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/uva_para_processamento/arvore/CON T000gasuo51v02wx5ok04xjloy1d1b300.html#> Acesso em: 11/02/2019.

HABIBI, Y.; MAHROUZ, M.; VIGNON, R. Isolation and structure of D -xylans from pericarp seeds of *Opuntia ficus - indica* prickly pear fruits. **Carbohydrate Research**, v. 337, p. 1593–1598, 2002.

HABIBI, Y.; MAHROUZ, M.; VIGNON, M. R. Isolation and Structure Characterization of a (4-O-Methyl-D-glucurono)-D-xylan from the Skin of *Opuntia ficus-indica* Prickly Pear Fruits. **Journal of Carbohydrate Chemistry**, v. 22, n. 5, p. 331–337, 2003.

HARDY, P. J. CHANGES IN VOLATILES OF MUSCAT GRAPES. **Phytochemistry**, v. 9, p. 709–715, 1970.

HARHOLT, J.; SUTTANGKAKUL, A.; SCHELLER, H. V. Biosynthesis of Pectin. **Plant Physiology**, v. 153, p. 384–395, 2010.

HARRIS, P. J.; SMITH, B. G. Plant cell walls and cell-wall polysaccharides : structures , properties and uses in food products. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, n. 2, p. 129–143, 2006.

INTERNATIONAL ORGANISATION OF VINE AND WINE. OIV Statistical Report on World Vitiviniculture. **2018 World Vitiviniculture Situation.**, 2018.

JACKSON, R. **Wine Science**. 3ª ed. Elsevier Ltd, 2008.

JACOBSEN, N. E. **NMR data interpretation explained: understading 1D and 2D NMR spectra of organic compounds and natural products**. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2017.

KENNEDY, J. A.; SAUCIER, C.; GLORIES, Y. Grape and Wine Phenolics : History and Perspective. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 57, n. 3, p. 20–21, 2006.

KOBAYASHI, H. *et al.* linkages obtained from Candida kefir IFO 0586 strain. **Carbohydrate Research**, v. 267, p. 299–306, 1995.

KUHN, N. *et al.* Berry ripening : recently heard through the grapevine. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 16, p. 4543–4559, 2014.

KUHN, R. C. *et al.* Evaluation of fructooligosaccharides separation using a fixed-bed column packed with activated charcoal. **New Biotechnology**, v. 31, n. 3, p. 237–241, 2014b.

LAMA-MUÑOZ, A. *et al.* Production, characterization and isolation of neutral and pectic oligosaccharides with low molecular weights from olive by-products thermally treated. **Food Hydrocolloids**, v. 28, n. 1, p. 92–104, 2012.

LIPKE, P. N.; OVALLE, R. Cell Wall Architecture in Yeast : New Structure and New Challenges. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 15, p. 3735–3740, 1998.

MARAI, J. Terpene concentrations and wine quality of Vitis vinifera L . cv . Gewürztraminer as affected by grape maturity and cellar practices. **Vitis**, v. 26, p. 231–245, 1987.

MARTÍNEZ-LAPUENTE, L. *et al.* Changes in polysaccharide composition during sparkling wine making and aging. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 50, p. 12362–12373, 2013

MARTÍNEZ-LAPUENTE, L. *et al.* Role of major wine constituents in the foam properties of white and rosé sparkling wines. **Food Chemistry**, v. 174, p. 330–338, 2015.

MARTÍNEZ-LAPUENTE, L. *et al.* Influence of Grape Maturity on Complex Carbohydrate Composition of Red Sparkling Wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 24, p. 5020–5030, 2016.

MARTÍNEZ-LAPUENTE, L. *et al.* Polysaccharides, oligosaccharides and nitrogenous compounds change during the ageing of Tempranillo and Verdejo sparkling wines. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 1, p. 291–303, 2018.

MATEUS, N. *et al.* Isolation and Structural Characterization of New Acylated Anthocyanin – Vinyl – Flavanol Pigments Occurring in Aging Red. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 277–282, 2003.

MATEUS, N. *et al.* NMR structure characterization of a new vinylpyranoanthocyanin – catechin pigment (a portisin). **Tetrahedron Letters** **45**, v. 45, p. 3455–3457, 2004.

MATSUHIRO, B. *et al.* Determination of low molecular weight carbohydrates in Cabernet sauvignon red wines. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 54, n. 4, p. 405–407, 2009.

MATULOVÁ, M. *et al.* Structure of arabinogalactan oligosaccharides derived from arabinogalactan-protein of Coffea arabica instant coffee powder. **Carbohydrate Research**, v. 346, n. 8, p. 1029–1036, 2011.

MAZZA, G. J. Anthocyanins and heart health. **Ann Ist super sAnltà**, v. 43, n. 4, p. 369–374, 2007.

MCGOVERN, P. E.; FLEMING, S. J.; KATZ, S. H. **The Origins and Ancient History of Wine**. 2ª ed. [s.l.] Routledge - Taylor & Francis Group, 2005.

MELLO, L. M. R. Vitivinicultura brasileira: panorama 2017. 2018. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/187913/1/Comunicado-Tecnico-207.pdf>>. Acesso em: 04/02/2019.

MILAN, E. **Conheça a Cabernet Franc**. Disponível em: <https://revistaadega.uol.com.br/artigo/cabernet-franc_10078.html>. Acesso em: 14/02/2019.

MORALES, V. *et al.* Rapid Separation on Activated Charcoal of High Oligosaccharides in Honey. **Chromatographia**, v. 64, n. 3–4, p. 1–6, 2006

MORENO-ARRIBAS, M. V.; POLO, M. C. **Wine Chemistry and Biochemistry**. [s.l.] Springer Science+Business Media, LLC, 2009.

NAKANISHI, K.; YOKOTSUKA, K. Isolation of Two Glucodisaccharides from Japanese Wines. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 67, n. 3, p. 148–152, 1989.

NASCIMENTO, A. M. *et al.* Gastroprotective effect and structure of a rhamnogalacturonan from *Acmella oleracea*. **Phytochemistry**, v. 85, p. 137–142, 2013.

OTAKA, K. Functional Oligosaccharide and its new aspect as immune modulation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 6, n. 1, p. 3–9, 2006.

PANG, X. *et al.* Purification , characterization and biological activity on hepatocytes of a polysaccharide from *Flammulina velutipes* mycelium. **Carbohydrate Polymers**, v. 70, p. 291–297, 2007.

PAVIA, D. L. *et al.* **Introdução à Espectroscopia**. 5 ed. Cengage Learning, Bellingham, Washington, 2016.

PELLERIN, P. *et al.* Characterization of 5 type II arabinogalactan protein fractions from red wine of increasing uronic-acid content. **Carbohydrate Research**, v. 277, n. 1, p. 135–143, 1995.

PELLERIN, P. *et al.* Structural characterization of red wine RG II. **Carbohydrate Research**, v. 290, p. 183–197, 1996.

PELLERIN, P.; CABANIS, J. Les glucides. In **Oenologie: fondements scientifiques et technologiques**, p. 40–92, 1998.

POPOV, S. V *et al.* Chemical composition and anti-inflammatory activity of a pectic polysaccharide isolated from sweet pepper using a simulated gastric medium. **Food Chemistry**, v. 124, n. 1, p. 309–315, 2011.

QUIJADA-MORÍN, N. *et al.* Relationship between the sensory-determined astringency and the flavanolic composition of red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 50, p. 12355–12361, 2012.

QUIJADA-MORÍN, N. *et al.* Polyphenolic, polysaccharide and oligosaccharide composition of Tempranillo red wines and their relationship with the perceived astringency. **Food Chemistry**, v. 154, p. 44–51, 2014.

RENARD, C. M. G. C. *et al.* Isolation and structural characterisation of rhamnogalacturonan oligomers generated by controlled acid hydrolysis of sugar-beet pulp. **Carbohydrate Research**, v. 305, n. 2, p. 271–280, 1998.

RIBÉREAU-GAYON, P. **Recherches sur les anthocyanes des végétaux**. Application au genre Vitis. Librairie general de l'enseignement, Paris, 1959.

RIBÉREAU-GAYON P.; *et al.* **Handbook of Enology: The chemistry of wine. Stabilization and treatments**. vol. 2, 2nd ed. 451p. John Wiley & Sons, West Sussex. 2006.

RIOU, V. *et al.* Aggregation of grape seed tannins in model wine - Effect of wine polysaccharides. **Food Hydrocolloids**, v. 16, n. 1, p. 17–23, 2002.

RIZZON, L. A.; DALL'AGNOL, I. **Vinho Tinto - Coleção Agroindústria Familiar**. Disponível em:
<<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/58590/1/RIZZON-VinhoTinto-2007.pdf>>. Acesso em: 12/02/2019

RODRIGO, R.; MIRANDA, A.; VERGARA, L. Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, n. 5–6, p. 410–424, 2011.

RODRIGUES, H.; PARR, W. V. Contribution of cross-cultural studies to understanding wine appreciation : A review. **Food Research International**, v. 115, p. 251–258, 2019.

RODRÍGUEZ-CARVAJAL, M. A. *et al.* The three-dimensional structure of the mega-oligosaccharide rhamnogalacturonan II monomer: a combined molecular modeling and NMR investigation. **Carbohydrate Research**, v. 338, n. 7, p. 651–671, 2003.

SASSAKI, G. L. *et al.* TLC of Carbohydrates. In: WAKSMUNDZKA, M.; SHERMA, J.; KOWALSKA, T. **Thin Layer Chromatography in Phytochemistry**. New York: CRC Press v. 99, p. 255–276, 2008.

SASSAKI, G. L.; SOUZA, L. M. Mass Spectrometry Strategies for Structural Analysis of Carbohydrates and Glycoconjugates. In: COELHO, A. V.; FRANCO, C.F. **Tandem Mass Spectrometry - Molecular Characterization**. Rijeka: Intech 1 ed. p. 81 - 116, 2013.

SASSAKI, G. L. *et al.* Monosaccharide composition of glycans based on Q-HSQC NMR. **Carbohydrate Polymers**, v. 104, n. 1, p. 34–41, 2014.

SEGANE, S.R. *et al.* Grape Maturity and Selection: Automatic Grape Selection. **Red Wine Technology**, In: MORATA, A. (Ed.). Elsevier Inc., 1. ed. p. 1–16. 2019.

SHAKHMATOV, E. G. *et al.* Structural characteristics of water-soluble polysaccharides from *Heracleum sosnowskyi* Manden. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, p. 521–528, 2014.

SHAKHMATOV, E. G.; ATUKMAEV, K. V.; MAKAROVA, E. N. Structural characteristics of pectic polysaccharides and arabinogalactan proteins from

Heracleum sosnowskyi Manden. **Carbohydrate Polymers**, v. 136, p. 1358–1369, 2016.

SHIBATA, N. *et al.* Sequential Nuclear Magnetic Resonance Assignment of β -1, 2-Linked Mannooligosaccharides Isolated from the Phosphomannan of the Pathogenic Yeast *Candida albicans* NIH B-792 Strain. **Biochemistry**, v. 31, n. 24, p. 5680–5686, 1992.

SHIRAISHI, M.; FUJISHIMA, H. Evaluation of table grape genetic resources for sugar, organic acid , and amino acid composition of berries. **Euphytica**, v. 174, n. 1, p. 1–13, 2010.

SOARES, B.F.S. **Isolamento do 2'-fucosil-lactose do leite humano: Análise da sua atividade em processos inflamatórios e da conformação tridimensional em solução.** 2017. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2017.

STIPP, M. C. *et al.* Necroptosis mediates the antineoplastic effects of the soluble fraction of polysaccharide from red wine in Walker-256 tumor-bearing rats. **Carbohydrate Polymers**, v. 160, p. 123–133, 2017.

TANIGUCHI, H.; HONNDA, Y. Amylases. **Encyclopedia of Microbiology**, p. 159–173, 2009.

TEAGUE, C. *et al.* Ethyl glucoside in human urine following dietary exposure : Detection by ¹H NMR spectroscopy as a result of metabonomic screening of humans Ethyl glucoside in human urine following dietary exposure : detection by ¹H NMR spectroscopy as a result of metabo. **The Analyst**, v. 129, p. 259–264, 2004.

TEIXEIRA, A. *et al.* Berry Phenolics of Grapevine under Challenging Environments. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 18711–18739, 2013.

TIMELL, T. E.; SYRACUSE, N. Y. Recent Progress in the Chemistry of Wood Itemicelluloses Zusammenfassung. **Wood Science and Technology**, v. 1, p. 45–70, 1967.

VIDAL, S. *et al.* Structural characterization of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II: evidence for the backbone location of the aceric acid-containing oligoglycosyl side chain. **Carbohydrate Research**, v. 326, p. 277–294, 2000.

VIDAL, S. *et al.* The polysaccharides of red wine: Total fractionation and characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, n. 4, p. 439–447, 2003.

VIDAL, S. *et al.* The mouth-feel properties of polysaccharides and anthocyanins in a wine like medium. **Food Chemistry**, v. 85, n. 4, p. 519–525, 2004.

VINOGRADOV, E.; PETERSEN, B.; BOCK, K. Structural analysis of the intact polysaccharide mannan from *Saccharomyces cerevisiae* yeast using ¹H and ¹³C NMR spectroscopy at 750 MHz. **Carbohydrate Research**, v. 307, n. 1–2, p. 177–183, 1998.

WALLACE, T. C. Anthocyanins in Cardiovascular Disease. **American Society for Nutrition. Adv. Nutr**, v. 2, n. 1, p. 1–7, 2011.

WANSBROUGH, H. *et al.* CHEMISTRY IN WINEMAKING. **VI-Food-B-Wine**, p. 3, 2017.

WEISKIRCHEN, S.; WEISKIRCHEN, R. Resveratrol : How Much Wine Do You Have to Drink to Stay Healthy ? **American Society for Nutrition. Adv. Nutr**, v. 7, n. 4, p. 706–718, 2016.

WISHART, D. S. *et al.* HMDB 4.0: The human metabolome database for 2018. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. D1, p. D608–D617, 2018.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 2, n. 1, p. 65-67, 1963a.

YANG, B. Sugars, acids, ethyl b-D -glucopyranose and a methyl inositol in sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) berries. **Food Chemistry**, v. 112, p. 89–97, 2009.

YANG, J. *et al.* The structure changes of water-soluble polysaccharides in papaya during ripening. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 115, p. 152–156, 2018.

ZERBIB, M. *et al.* New flavanol O-glycosides in grape and wine. **Food Chemistry**, v. 266, p. 441–448, 2018.